

Verfahren zur Herstellung zyklischer Moleküle

Auf der Suche nach neuen Medikamenten geraten Naturprodukte
5 zunehmend in den Fokus der Wissenschaft und dienen ihr als
Leitstruktur für die Entwicklung neuer Wirkstoffe. Diese
pharmakologisch relevanten Moleküle werden von Bakterien oder
Pilzen synthetisiert, und ihr Wirkungsspektrum reicht von

- antibiotischen (Infektionskrankheiten) über
- 10 - zytostatischen (Krebs) bis zu
- immunsuppressiven (Organtransplantation) Eigenschaften.

Die Synthese dieser kleinen Moleküle erfolgt in der Natur
meist an großen Multienzymen, die hauptsächlich Peptide,
Polyketide oder ein Hybrid aus beiden herstellen. Prominente
15 Beispiele für solche Verbindungen sind Penicillin, Cepha-
losporin, Daptomycin, Epothilon und Cyclosporin, die zum Teil
schon seit langer Zeit erfolgreich in der Medizin eingesetzt
werden. Eine gemeinsame Eigenschaft dieser Verbindungen ist
die zyklische Struktur, die für die biologische Aktivität
20 entscheidend ist. Viele der oben genannten Verbindungen
besitzen keine oder eine stark verminderte Wirksamkeit, wenn
sie linear vorliegen. Im Gegensatz zu linearen Molekülen ist
bei zyklischen Molekülen die konformatorische Flexibilität
(die freie Bewegung und Rotation) durch den Ringschluss
25 vermindert, was nur die biologisch aktive Form in Erscheinung
treten lässt. Die Natur hat hier eine interessante Strategie
gewählt, die sicherstellt, dass das synthetisierte Molekül in
nur einer Modifikation vorkommt und daher spezifisch mit nur
einem „Target“ (Angriffsziel) im biologischen System inter-
30 agiert. Angriffsziele sind meistens essentielle Bestandteile
oder Funktionen einer Zelle, die für ihr Überleben wichtig
sind, wie z.B. die Zellwand oder die Proteinsynthese. Da

diese Moleküle selektiv bakterielle, fungale oder cancerogene (Krebs-) Zellen bzw. Viren eliminieren und gleichzeitig körpereigenes Zellgewebe verschonen, sind sie in der Therapie von Infektionskrankheiten und Krebs von enormer Bedeutung.

5 Daneben können sie auch die von T-Zellen verursachte Immunabwehr unterdrücken, was die Organabstoßung bei Transplantationen wirksam verhindert (Cyclosporin).

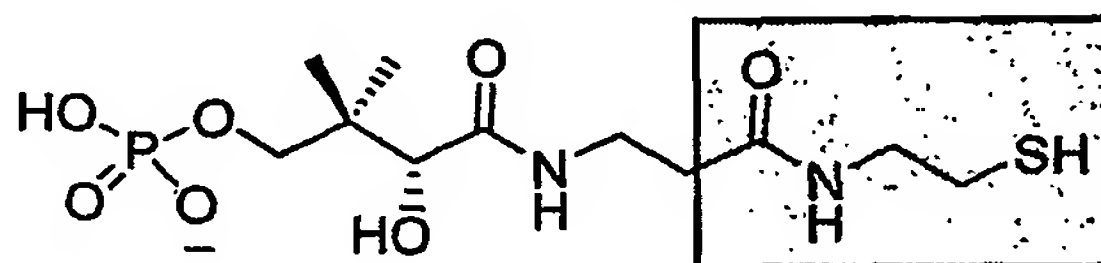
Durch den intensiven Einsatz in der Medizin haben aber leider viele dieser Verbindungen ihre Wirksamkeit verloren, da die

10 zu bekämpfenden Systeme Resistenzmechanismen entwickelt haben. Darüber hinaus besitzen viele potente Wirkstoffe sehr starke Nebenwirkungen, was ihren medizinischen Einsatz einschränkt (z.B. Nierentoxizität von Bacitracin). Daher besteht ein großer Bedarf an neuen bzw. optimierten Chemotherapeutika
... 15 -(Antibiotika, Cytostatika und Immunsuppressiva), die möglichst wenige Nebenwirkungen aufweisen und hoch spezifisch mit ihrem „Target“ interagieren. Für die Identifizierung solcher neuen Wirkstoffe können die bereits bekannten, potenten zyklischen Naturprodukte als Leitstruktur dienen und
20 systematisch verändert und auf verbesserte Wirksamkeit getestet werden.

Derartige Naturstoffe werden im biologischen System von nicht ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) hergestellt und von sogenannten Thioesterasen/Zyklasen zyklisiert, die sich in
25 guter Ausbeute rekombinant *in vitro* überproduzieren lassen. Diese Enzyme können zuverlässig und effizient lineare Peptide einer bestimmten Leitstruktur in zyklische Moleküle überführen. Die Triebkraft der Zyklisierungsreaktion im natürlichen System ist die Aktivierung des C-Terminus (d. h. der freien
30 Carbonsäure des linearen Peptids) durch eine Thioesterabgangsgruppe, dem Kofaktor Phosphopantethein. Im artifiziellen System wird die rekombinante Zyklase mit einem verkürzten Thioester-Mimic dieses natürlichen Kofaktors umgesetzt (N-

Acetylcysteamin, SNAC). Unter verkürzten Thioester-Mimics sind dabei Substanzen zu verstehen, die

- die Funktion des natürlichen Kofaktors imitieren, aber nicht natürlichen Ursprungs sind,
- 5 - eine Thio-Abgangsgruppe besitzen und
- deren aliphatische Kette kürzer ist als die des natürlichen Kofaktors Phosphopantethein.



Phosphopantethein und SNAC (markiert)

10

Mit der SNAC-Abgangsgruppe konnten bisher die Tyrocidin- und Surfactin- Zyklasen charakterisiert werden. Viele andere biologisch relevante zyklische Verbindungen, wie z.B. Fengycin, Mycosubtilin, Syringomycin und Bacitracin zeigen bei Verwendung der SNAC-Abgangsgruppe keine Zyklisierungsaktivität mit dem jeweiligen Enzym, was mit einer inkorrekten Faltung des Enzyms erklärt wird. Andere Verbindungen, wie z.B. CDA (Calcium dependent antibiotic) und Bacillibactin zeigen zum Teil sehr schlechten Umsatz mit den bekannten Substratanaloga.

15

20

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind nicht natürliche, synthetische Kofaktoren, deren chemische Abgangsgruppenqualitäten für eine effiziente Enzymacylierung sorgen. Entgegen der allgemein in der Fachwelt verbreiteten Annahme findet keine „Erkennung“ des natürlichen Kofaktors Panthethein durch das Enzym statt, weshalb einzig das chemische Übertragungspotenzial des Acylrestes auf das aktive Zentrum im Enzym die entscheidende Größe ist. Die in der Fachwelt verbreitete Annahme, die „Erkennung“ des natürlichen Kofaktors Panthethein durch das Enzym sei der Ausschlag gebende Faktor für

25

30

die Zyklisierungsreaktion, ist beispielsweise dargestellt in
JW Trauger, RM Kohli, HD Mootz, MA Marahiel and CT Walsh,
Nature 2000, 407: 215-218; R Aggarwal, P Caffrey, PF Leadly,
CJ Smith and J Staunton, Journal of the Chemical Society
5 *Communications 1995, 15: 1519-1520* sowie *RS Gokhale, D Hunzi-*
ker, DE Cane and C Khosla, Chemical Biology 1999, 6: 117-125.

Im Gegensatz zu den etablierten SNAC-Substraten weist z.B.
Thiophenol als erfindungsgemäße ladungsstabilisierte Abgangs-
10 gruppe keinerlei strukturelle Ähnlichkeit mit dem natürlichen
Kofaktor auf, besitzt aber eine deutlich bessere Abgangsgrup-
penqualität, da sich das Thiol in Konjugation mit einem
aromatischen Benzolring befindet. Bei anderen erfindungsgemä-
ßen Abgangsgruppen befindet sich die Thiol- oder Hydroxyfunk-
15 tion an einem sp^3 -Kohlenstoffatom, das direkt an den aromati-
schen Ring gebunden ist (α -C-Atom), so dass das aromatische
System einen induktiven Effekt auf die Thio- oder Hydro-
xygruppe ausübt. Derartige erfindungsgemäße Abgangsgruppen
werden nachfolgend als araliphatische Thio- oder Hydroxy-
20 Abgangsgruppen bezeichnet. Dem Fachmann ist bekannt, dass
sich der induktive Effekt eines aromatisches System stabili-
sierend auf die an ein α -C-Atom gebundenen Gruppen auswirkt
und damit ihre Abgangsgruppenqualität erhöht. Dies kann z.B.
in *Michael B. Smith & Jerry March: March's Advanced Organic*
25 *Chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure. 5th Edition*
2000, John Wiley & Sons Inc., New York / Chichester / Brisba-
ne / Toronto / Singapore nachgeschlagen werden. Im Falle des
SNACs ist weder eine Konjugation mit einem aromatischen oder
heteroaromatischen System noch eine Stabilisierung durch den
30 induktiven Effekt eines aromatischen Systems in α -Stellung
zum Kohlenstoffatom, an das die Thiogruppe gebunden ist,
vorhanden, weshalb viele Enzyme keine Aktivität mit diesen
Substraten zeigen oder niedrige k_{cat}/K_M Werte aufweisen.

[Beschreibung und Stand der Technik]

Viele wertvolle Pharmazeutika besitzen zyklische Strukturen, wobei die Ringe dieser zyklischen Strukturen aus 5 oder mehr Atomen gebildet sind. Die aus dem Stand der Technik bekannten Methoden der synthetischen Chemie zur Darstellung zyklischer Verbindungen weisen zahlreiche Nachteile auf. Zu diesen Nachteilen gehören beispielsweise, aber nicht ausschließlich, geringe Ausbeuten der zyklischen Produkte, die Notwendigkeit von Schutzgruppen, um reaktive funktionelle Gruppen zu blockieren oder zu schützen, sowie die Notwendigkeit, diese Reaktionen in organischen Lösungsmitteln durchzuführen. Diese synthetischen Probleme können durch enzymatische Verfahren überwunden werden.

Die EP 0 832 096 B1 beschreibt ein Verfahren, mit dem ein nicht oxidiertes N-terminales Cystein eines ersten Oligopeptids mit dem C-terminalen Thioester eines zweiten Oligopeptids umgesetzt wird. Die Reaktion wird durch ein Thiol katalysiert, wobei die Thiogruppe direkt an einen aromatischen oder heteroaromatischen Ring gebunden ist. Dabei bildet sich ein β -Aminothioester als Zwischenprodukt, der sich spontan intramolekular umlagert, wobei die Amidbindung des Ligationsproduktes der beiden Oligopeptide entsteht. Nachteilig bei diesem Verfahren ist, dass das erste Oligopeptid zwingend ein N-terminales Cystein besitzen muss und dass es nicht für Zyklisierungsreaktionen geeignet ist.

Dagegen beschreibt die US 6,307,018 B1 eine allgemeine Methode, um ein erstes C-terminales α -Thioesterpeptid mit einem zweiten N-terminalen Aminosäure-Peptidsegment zu verbinden, bei der das N-terminale Aminosäure-Peptidsegment kein N-terminales Cystein besitzen muss. Allerdings muss das zweite Oligopeptid eine sekundäre Aminogruppe aufweisen, die über das N-Atom dieser sekundären Aminogruppe an eine nicht oxidierte Sulfhydrylgruppe eines aromatischen Thiols gebunden ist. Bei dem aromatischen Thiol kann es sich um Thiophenol,

Benzylmercaptan oder ein S-Alkylbenzylmercaptan handeln.
Darüberhinaus ist bei der US 6,307,018 B1 nachteilig, dass
entweder der C-Terminus des ersten oder der N-Terminus des
zweiten Oligopeptids Glycin sein muss. Die Methode ist nicht
5 für die Zyklisierung von Peptiden geeignet.

Die US 2002/0192773 A1 beschreibt ein Verfahren zur enzymati-
schen Herstellung makrozyklischer Moleküle, bei dem rekombi-
nante Thioesterase-Domänen (TE-Domänen, Zyklasen) aus einem
PKS- oder NRPS-Multidomänensystem mit einem Substrat umge-
10 setzt werden, wobei das Substrat einen über eine Thioesterab-
gangsgruppe aktivierten Acylrest und ein anhängendes Nucle-
ophil enthält. Aktivierter Acylrest und Nucleophil sind über
ein lineares Rückgrat voneinander getrennt. Nachteilig hier-
bei ist, dass die Abgangsgruppe nicht ladungsstabilisiert
15 ist.

Durch eine unzureichende Zyklisierungsaktivität vieler Enzyme
bei Verwendung strukturell analoger Abgangsgruppen zum natür-
lichen Kofaktor wie beispielsweise Coenzym A, Phosphopan-
20 tethein und N-Acylcysteamine sind TE-Domänen in ihrer Anwen-
dung jedoch stark limitiert. Die vorliegende Erfindung über-
windet durch den Einsatz neuartiger Abgangsgruppen diese
Einschränkung und ermöglicht nun die Erstellung von diversen
zyklischen Wirkstoffbibliotheken vieler pharmakologisch
25 bedeutender Molekülklassen.

Überraschend und im Widerspruch zum Stand der Technik wurde
gefunden, dass die Erkennung der Substrate durch Enzyme bei
der Zyklisierung von Peptiden und Proteinen keine Rolle
spielt und dass ladungsstabilisierte Thio- und Hydroxyverbin-
30 dungen gute Abgangsgruppen für die Acylierungsreaktion von
Peptidzyklasen darstellen. Unter ladungsstabilisierten Thio-
und Hydroxyverbindungen werden dabei aromatische oder hetero-
aromatische Ringsysteme verstanden, bei denen eine Hydroxy-

oder Thiogruppe an eines der Ringatome oder an ein an das Ringsystem gebundenes Kohlenstoffatom gebunden ist.

Die vorliegende Erfindung stellt Substrate bereit, mit deren Hilfe die enzymatische Zyklisierung von solchen Peptiden und Proteinen möglich ist, die nach dem Stand der Technik nicht der Zyklisierung zugänglich waren. Des weiteren kann die Ausbeute von Proteinen und Peptiden, die mit Methoden des Standes der Technik zyklisiert werden können, mit Hilfe der erfindungsgemäßen Substrate gesteigert werden. Darüber hinaus liefert die vorliegende Erfindung ein Verfahren, um weitere an der Zyklisierung von Peptiden und Proteinen beteiligte Substrate chemisch zu verändern und damit der Zyklisierung leichter zugänglich zu machen.

15

[Aufgabe der Erfindung]

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, das Verfahren zur Darstellung zyklischer Peptide durch Umsetzung linearer Peptide mit Peptidzyklasen zu verbessern, wobei unter Verbesserung eine Erhöhung der Ausbeute an zyklischem Peptid und / oder eine Beschleunigung der Zyklisierungsreaktion und / oder eine Zyklisierung von mit bisherigen Verfahren nicht zyklisierbaren Peptiden verstanden wird. Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide, bei dem eine Peptidzyklase mit einem linearen Peptid in Kontakt gebracht wird, das lineare Peptid einen Acylrest enthält, der durch eine chemisch mit diesem Acylrest verbundene nucleophile Abgangsgruppe aktiviert ist, der aktivierte Acylrest des linearen Peptids das Zentrum der Peptidzyklase selektiv acyliert, wobei die nucleophile Abgangsgruppe unter Bildung des zyklischen Peptids abgespalten wird und zyklische Peptide mit Ringen aus mindestens 5 Atomen gebildet werden, wobei die nucleophile Abgangsgruppe, die mit dem Acylrest des linearen Peptids chemisch verbunden ist und

- diesen aktiviert, ladungsstabilisiert ist und die ladungsstabilisierte Abgangsgruppe an die Acylgruppe der C-terminalen Carbonsäure des Peptids gebunden ist. Unter „Substraten“ werden hierbei lineare Peptide verstanden, an die eine nucleophile, ladungsstabilisierte erfindungsgemäße Abgangsgruppe chemisch gebunden ist. Unter ladungsstabilisierten Thio- und Hydroxyverbindungen werden dabei aromatische oder heteroaromatische Ringsysteme verstanden, bei denen eine Hydroxy- oder Thiogruppe an eines der Ringatome gebunden ist oder an ein Kohlenstoffatom, welches mit dem Ringsystem verbunden ist, wobei die chemische Struktur des aromatischen oder heteroaromatischen Systems so gewählt ist, dass eine an der Thio- oder Hydroxygruppe auftretende negative Ladung stabilisiert wird. Das erfindungsgemäße Verfahren führt zu höheren Ausbeuten an zyklischen Peptiden und / oder verbessert ihre Ausbeute und ermöglicht es erstmalig, auch Peptide wie Fengycin, Mycosubtilin, Syringomycin und Bacitracin zu zyklisieren, die mit den Methoden des Standes der Technik nicht zyklisierbar sind.
- 20 Die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Substrate erfolgt durch die Synthese des linearen Peptids mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Standardmethoden der Festphasenpeptidsynthese, darauf folgende Kupplung der freien Carbonsäure des linearen Peptids (freie Peptidsäure) an die erfindungsgemäße Thiol- oder Hydroxy-Abgangsgruppe, optionale Reinigung des so erhaltenen erfindungsgemäßen Substrates, darauf folgende Umsetzung des so erhaltenen erfindungsgemäßen Substrates mit einer Peptid-Zyklase und Reinigung des auf diese Weise erhaltenen zyklischen Peptids.
- 30 Dazu werden 1 Äquivalent (eq) der freien Peptidsäure mit 2 eq Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), 2 eq N-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 10 eq der jeweiligen Abgangsgruppe versetzt und in THF für 30 min gerührt. Nach Zugabe von 0,5 eq Kaliumkarbonat

wird die Reaktion für weitere 2,5 h agitiert und darauf
filtriert, um ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff (DCH)
abzutrennen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer
entfernt und das Peptid mit 95 % Trifluoressigsäure (TFA),
5 2,5 % Wasser und 2,5 % Triisopropylsilan für 3 h entschützt.
Das Reaktionsgemisch wird darauf in eiskalten Diethylether
gegeben, worauf das Substrat präzipitiert. Dieser Schritt
stellt eine Reinigung dar, bei der Reaktionsnebenprodukte
abgetrennt werden, und führt zu einer Reinheit des Substrates
10 von bis zu 80%, was im Allgemeinen für die weitere Umsetzung
des Substrates mit einer Peptidzyklase ausreichend ist.
Optional kann die Reinheit des Substrat anschließend mittels
präparativer HPLC erhöht werden.

Enthält das lineare Peptid neben der C-terminalen freien
15 COOH-Gruppe weitere freie COOH-Gruppen innerhalb der Peptid-
kette, wie beispielsweise COOH-Gruppen von Glutaminsäure und
/ oder Asparaginsäure, so müssen diese nicht C-terminalen
freien COOH-Gruppen vor der Umsetzung des linearen Peptids
mit einem Aktivierungsreagenz mit einer geeigneten orthogona-
20 len Schutzgruppe geschützt werden, die nach Darstellung des
erfindungsgemäßen Substrates wieder abgespalten werden muss.
Geeignete Schutzgruppen und geeignete Methoden zu deren
Entfernung sind dem Fachmann bekannt und können beispielswei-
se in Theodora W. Greene and Peter G. M. Wuts, „Protective
25 groups in organic synthesis“, 2nd Edition 1991, John Wiley &
Sons Inc., New York / Chichester / Brisbane / Toronto /
Singapore nachgeschlagen werden.

Das gereinigte Substrat mit der erfindungsgemäßen Abgangs-
gruppe wird darauf mit der jeweiligen Peptidzyklase im Ver-
30 hältnis 1 (Enzym) : 100 (Substrat) in 25 mM HEPES, 50 mM NaCl
bei pH 7 und Raumtemperatur für 30-60 min inkubiert. Die
Herstellung der HEPES-Lösung ist dem Fachmann bekannt und
wurde in *J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis: Molecular
Cloning: A Laboratory Manual Vol. I-III, Cold Spring Harbor*

Laboratory Press, 1982, beschrieben. Die Identifizierung und Quantifizierung des Reaktionsproduktes erfolgt mittels analytischer HPLC.

5 Alternativ zum Aktivierungsreagenz DCC lassen sich die erfindungsgemäßen Substrate auch durch Umsetzung der Peptidsäure mit der jeweiligen Abgangsgruppe in Gegenwart anderer, den C-Terminus der Peptidsäure aktivierenden Reagenzien umsetzen. Entsprechungen sind bekannt und können, ohne den Schutzbe-
10 reich der Patentansprüche zu verlassen, verwendet werden. Hierzu zählen beispielsweise die dem Fachmann bekannten Aktivierungsreagenzien DCI, PyClop, HBTU, HATU, HOSu, TBTU, T3P, BopCl und 3-Cl-1-Pyridiniumiodid. Als Kupplungsadditive sind neben dem oben aufgeführten HOBt beispielsweise auch die
15 dem Fachmann bekannten Substanzen HÖAt und HONB verwendbar. Dem Fachmann ist bekannt, dass diese Reaktionen zweckmäßig unter Zugabe einer Base wie beispielsweise DIPEA durchgeführt werden. Dem Fachmann sind weiterhin verschiedene Lösungsmittel zur Verwendung in den genannten Verfahren bekannt. Er
20 kann diese Kombinationen von Aktivierungsreagenzien, Kupplungsadditiven, Basen und Lösungsmitteln mit seinem üblichen Wissen und der Standardliteratur selbst herstellen.

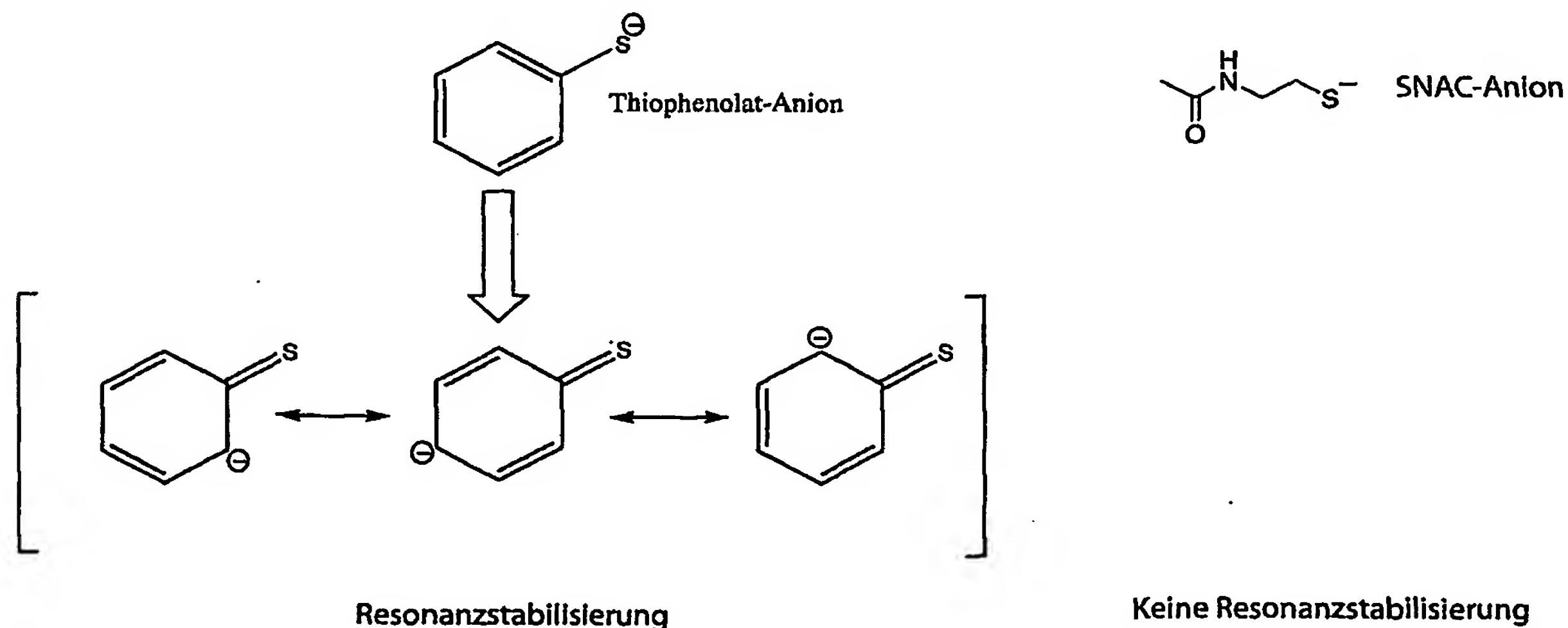
Als ladungsstabilisierte Abgangsgruppen werden bei der vor-
25 liegenden Erfindung chemische Verbindungen verstanden, die eine Thio- oder Hydroxyl-Gruppe besitzen und bei denen das freie Elektronenpaar des durch die Acylierungsreaktion freigesetzten Thiolat- oder Hydroxylat-Ions in Konjugation mit weiteren Elektronenpaaren von beispielsweise, aber nicht
30 ausschließlich, C=C- oder C=N-Doppelbindungen steht oder bei der die Thio- oder Hydroxygruppe an ein Kohlenstoffatom gebunden ist, das seinerseits an einen aromatischen oder heteroaromatischen Ring gebunden ist. Solche Verbindungen sind z.B. Oxo- und Thio-aromatische und -heteroaromatische

Verbindungen, aber auch ladungsstabilisierte aliphatische Oxo- und Thio- Abgangsgruppen. Diese Abgangsgruppen, wie z.B. Thiophenol, Phenol, 2,3,4,5,6-Pentafluorphenol, die Mercapto- anisole und Thiokresole sowie 2-Hydroxypyridin und 2-Thio
 5 pyridin funktionieren für die Acylierungsreaktion von Peptid-zyklasen, die keinerlei Ähnlichkeit mit dem natürlichen Kofaktor besitzen, und weisen verbesserte Eigenschaften für *in vitro* Zyklisierungsreaktionen auf.

10 Dies soll im Folgenden exemplarisch, aber nicht erschöpfend am Beispiel des Thiophenols erläutert werden:

Die Thiophenol-Abgangsgruppe weist bis auf die Thiolfunktion keine strukturelle Ähnlichkeit zum natürlichen 4'-Phospho-panthethein-Kofaktor auf. Die Thiolfunktion ist direkt an

15 einen aromatischen Phenylring gebunden. Dieses Strukturmerkmal verursacht die gegenüber den bisher beschriebenen Abgangsgruppen höhere Reaktivität dieser Verbindung. Beim nukleophilen Angriff des aktivierten Ser (= Serin) der katalytischen Triade im aktiven Zentrum des Enzyms wird diese
 20 Abgangsgruppe als Thiophenolat-Ion freigesetzt. Die resultierende negative Ladung am Schwefelatom kann dabei sehr gut durch den angrenzenden Phenylring delokalisiert werden.



Eine derartige Erhöhung und Stabilisierung der Elektronendichte tritt bei den SNAC-, CoA- und Ppant-Abgangsgruppen nicht auf. Dort bleibt die negative Ladung am Schwefelatom lokalisiert. Da aber in der Regel die Güte einer Abgangsgruppe proportional zu ihrer chemischen Stabilisierung ist, sind
5 SNAC-, CoA- und Ppant chemisch betrachtet schlechtere Abgangsgruppen als Thiophenol.

Dem Fachmann ist bekannt, dass das Austrittsvermögen und damit die Qualität einer Abgangsgruppe von der Fähigkeit der
10 Abgangsgruppe abhängt, eine negative Ladung zu stabilisieren. Unter Stabilisierung einer Ladung versteht der Fachmann dabei das Verteilen von Ladungen oder Teilladungen auf mehrere Atome oder Bindungen, so dass diese Ladung oder Teilladung nicht an einem einzigen Atom oder an einer einzigen Bindung
15 innerhalb eines Moleküls lokalisiert ist. Dabei sind dem Fachmann zwei verschiedene Möglichkeiten der Ladungsstabilisierung organischer Moleküle bekannt, die allgemein als mesomere oder Resonanz-Effekte (M-Effekte) und induktive Effekte (I-Effekte) bezeichnet werden. Unter einem mesomeren
20 oder Resonanz-Effekt versteht der Fachmann das schnelle und reversible Verschieben von π -Elektronenpaaren, welches in Systemen auftritt, die konjugierte π -Bindungen besitzen. Dem Fachmann ist bekannt, dass der mesomere Effekt über große Entfernungen und damit viele Bindungen hinweg wirksam ist,
25 wenn ein entsprechend ausgedehntes konjugiertes π -System vorliegt. In Ringverbindungen mit konjugierten π -Systemen nehmen auch Substituenten an der Mesomerie teil, sofern sie über freie π -Elektronenpaare verfügen oder diese aufnehmen können. Ist eine Ladung in einer substituierten Ringverbin-
30 dung mit konjugiertem π -System und mesomeriefähigen Substituenten zu stabilisieren, so hängt es von der Position der Substituenten zueinander ab, ob und welche dieser Substituen-

ten tatsächlich an der Ladungsstabilisierung durch Mesomerie teilnehmen. Dies ist dem Fachmann bekannt.

Besitzt ein Atom eine höhere Elektronegativität und damit eine stärkere Anziehung auf die Bindungselektronen als sein
5 mit ihm über eine σ -Bindung verbundenes Nachbaratom, oder ist ein Atom mit weiteren Atomen oder Atomgruppen verbunden, die Elektronen ziehend wirken, so wird die Bindungselektronenwolke der hier betrachteten σ -Bindung in Richtung auf den Elektronenzug verschoben, d.h. polarisiert. Diese Polarisation
10 einer σ -Bindung wird als Teilladung bezeichnet, da es sich hierbei um eine geringfügige Verschiebung von Elektronenwolken handelt und diese Verschiebung nicht zum Auftreten ganzzahliger Vielfacher der Elementarladung an einem bestimmten Atom führt. Die durch unterschiedliche Elektronegativitäten
15 und / oder unterschiedlichen Elektronenzug von Atomen und Atomgruppen hervor gerufene Polarisation von σ -Bindungen wird vom Fachmann auch als induktiver Effekt bezeichnet. Dem Fachmann ist bekannt, dass der induktive Effekt für einander benachbarte Bindungen am größten ist und mit zunehmender
20 Entfernung zu dem Atom oder der Atomgruppe, das / die ihn hervor ruft, rasch abnimmt. Dies kann z.B. in *Michael B. Smith & Jerry March: March's Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure. 5th Edition 2000, John Wiley & Sons Inc., New York / Chichester / Brisbane / Toronto*
25 / *Singapore* nachgeschlagen werden.

Der Fachmann unterscheidet positive und negative mesomere bzw. induktive Effekte. Als positiv wird ein solcher Effekt bezeichnet, wenn er die Elektronendichte in Form einer Ladung oder Teilladung an einem Atom oder einer Atomgruppe erhöht
30 (+M-Effekt, +I-Effekt), als negativ, wenn er die Elektronendichte verringert (-M-Effekt, -I-Effekt). Befinden sich beispielsweise an einem aromatischen System mehrere Substituenten, so üben sie ihre M- und I-Effekte unabhängig voneinander aus und können einander verstärkend, aber auch gegen-

läufig in Bezug auf die Ladungsstabilisierung an einem bestimmten Atom wirken. In der Regel wirken mesomere Effekte stärker als induktive.

In der vorliegenden Erfindung werden daher bevorzugt solche ladungsstabilisierten Abgangsgruppen gewählt, bei denen eine Hydroxy- oder Thiogruppe an eines der Ringatome eines aromatischen, heteroaromatischen oder araliphatischen Systems gebunden ist oder an ein Kohlenstoffatom, welches mit dem Ringsystem verbunden ist, wobei die chemische Struktur des aromatischen, heteroaromatischen oder araliphatischen Systems so gewählt ist, dass die Summe der mesomeren und induktiven Effekte der enthaltenen funktionellen Gruppen einen Elektronenzug auf das Thiolat- oder Hydroxylat-Ion ausübt und auf diese Weise dessen negative Ladung stabilisiert.

15

Ein weiteres wichtiges Kriterium zur Quantifizierung der Abgangsgruppenqualität ist der pK_A -Wert einer chemischen Verbindung: Je höher der pK_A -Wert, desto schlechter ist die jeweilige Abgangsgruppe. CoA, Ppant und SNAC haben pK_A -Werte von 10 - 11, während Thiophenol einen pK_A -Wert von 8 aufweist. Es lässt sich somit sagen, dass Thiophenol seine mangelnde strukturelle Überstimmung zum natürlichen Phosphopanthethein-Kofaktor überraschend und im Widerspruch zum Stand der Technik durch seine hohe chemische Reaktivität überkompensieren kann, was auch für andere aromatische, heteroaromatische und ladungsstabilisierte araliphatische Thiol- und Hydroxyl-Verbindungen gilt. Dabei werden vorteilhaft solche ladungsstabilisierten aromatische, heteroaromatische und araliphatischen Thiol- und Hydroxyl-Verbindungen als Abgangsgruppen verwendet, deren pK_A -Wert kleiner oder gleich 10, bevorzugt kleiner oder gleich 8 ist. Die Ringsysteme der erfindungsgemäßen aromatischen, heteroaromatischen und araliphatischen Thiol- und Hydroxyverbindungen können durch einen oder mehrere Substituenten mit positiven oder negativen

induktiven oder mesomeren Effekte substituiert sein, wobei die Gesamtheit der Effekte aller vorhandenen Substituenten elektronenziehend und damit ladungsstabilisierend auf das bei der enzymatischen Zyklisierung frei gesetzte Thiolat- oder
5 Hydroxylation wirkt.

Bei Verwendung von ladungsstabilisierten Thiol- und Hydroxyverbindungen zeigen auch solche Enzyme Zyklisierungsaktivität, die bei Verwendung der bisher bekannten Abgangsgruppen
10 als inaktiv klassifiziert wurden (ca. 2/3 aller bisher untersuchten). Enzyme, die auch bei Verwendung von SNAC als Abgangsgruppe zyklisieren, zeigen verbesserte kinetische Eigenschaften mit bis zu 15 fach gesteigerten k_{cat}/K_M Werten bei gleich bleibender Regio- und Stereoselektivität, wenn Thiophenol-Derivate an Stelle von SNAC-Abgangsgruppen verwendet
15 werden. Dies konnte am Beispiel des Surfactin-Thiophenols gezeigt werden (siehe Fig. 4). Surfactin zeigt ebenfalls verbesserte Reaktionsgeschwindigkeiten bei der Zyklisierung, wenn o-, m- oder p-Mercaptoanisol bzw. o-, m- oder p-Thiokresol als Abgangsgruppe verwendet werden.
20

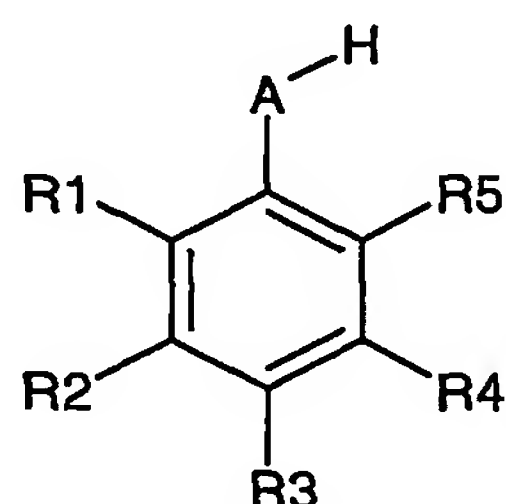
Die Katalyse von Peptid-Zyklasen lässt sich in zwei Teilschritte zerlegen:

- Der erste Teilschritt ist die Ausbildung des Peptidyl-O-TE-Intermediates durch Acylierung des aktivierten Ser-
25 Restes der katalytischen Triade.
- Der zweite Teilschritt ist die Deacylierung des Ser-Restes durch eine funktionelle Gruppe der gebundenen Peptidkette als internes Nukleophil.

Thioestergebundene Abgangsgruppen können ausschließlich die
30 katalytische Effizienz des ersten Teilschrittes beeinflussen: die Bildung des Peptidyl-O-TE-Intermediates. Experimente mit der neuen Abgangsgruppe Thiophenol bestätigen dies (siehe Fig. 4 bis Fig. 6). Eine Mutation im aktiven Zentrum des Enzyms zeigt keine Aktivität, was die abgangsgruppenbedingte

Acylierung und darauffolgende enzymatische Zyklisierung bestätigt.

Folgende aromatische, heteroaromatische und araliphatische
5 Grundelemente dienen als ladungsstabilisierte Abgangsgruppen:



(I)

mit

A = O, S und

sowie R1, R2, R3, R4 und R5, die unabhängig voneinander sind:

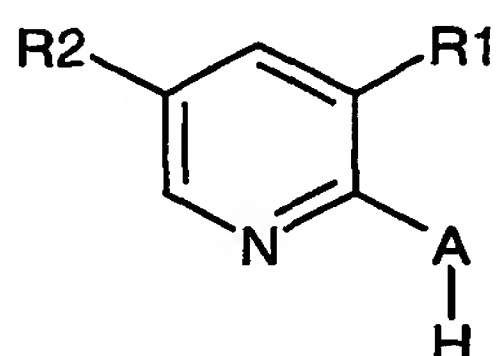
10 -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₂Cl, -SO₃H, -H, -NH₃⁺, -NL₃⁺, -
C(=O)L, -C(=O)Het, -O⁻, -NL₂, -NH₂, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -
OC(=O)L, -SL, -CO₂⁻, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -
Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl,
-Heteroaryl,

15 wobei

L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Hetero-
alkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl
für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl
für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis
20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear
oder verzweigt sind, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine
Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, Heteroalkyl für
eine Alkylgruppe steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome
ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel,
25 Phosphor ersetzt sind, die heterocyclischen Gruppen für einen
Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen stehen, worin bis zu 5
Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe
Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, Aryl
für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen

und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind, wobei die Bedingungen so gewählt sind, dass bei Temperaturen unter 200 °C und Atmosphärendruck keine explosiven Stoffe entstehen und die Verbindung bestehend aus linearen Peptiden und daran gebundenen erfindungsgemäßen Abgangsgruppen bei diesen Bedingungen nicht hydrolytisch gespalten werden,

10



(II)

mit

A = O, S und

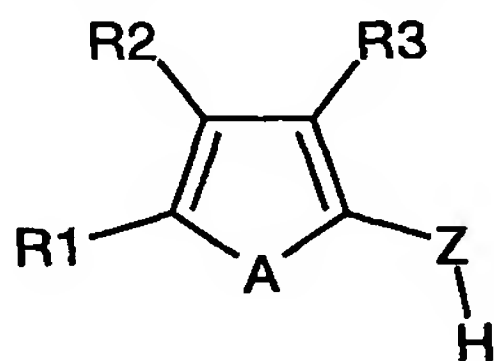
sowie R1 und R2, die unabhängig voneinander sind:

-NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₂Cl, -SO₃H, -H, -NH₃⁺, -NL₃⁺, -
 15 C(=O)L, -C(=O)Het, -O⁻, -NL₂, -NH₂, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -
 OC(=O)L, -SL, -CO₂⁻, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -
 Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl,
 -Heteroaryl,

wobei

20 L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear
 25 oder verzweigt sind, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, Heteroalkyl für eine Alkylgruppe steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, die heterocyclischen Gruppen für einen
 30 Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen stehen, worin bis zu 5

Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind, wobei die Bedingungen so gewählt sind, dass bei Temperaturen unter 200 °C und Atmosphärendruck keine explosiven Stoffe entstehen und die Verbindung bestehend aus linearen Peptiden und daran gebundenen erfindungsgemäßen Abgangsgruppen bei diesen Bedingungen nicht hydrolytisch gespalten werden, wobei dem Fachmann bekannt ist, dass Substituenten an C-4 oder C-6 des Pyridinringes keine Ladungsstabilisierung des an C-2 befindlichen Hydroxy- oder Thiol-Substituenten bewirken,



(III)

mit

A = O, S, und

Z = O, S,

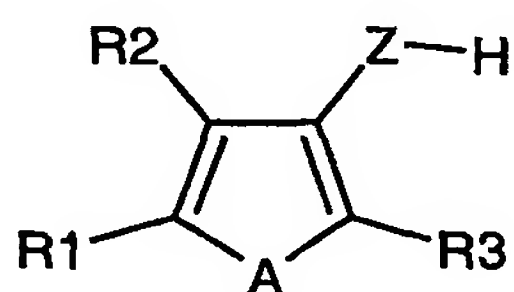
sowie R1, R2, und R3, die unabhängig voneinander sind:

-NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₂Cl, -SO₃H, -H, -NH₃⁺, -NL₃⁺, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O⁻, -NL₂, -NH₂, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO₂⁻, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

wobei

L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear

oder verzweigt sind, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, Heteroalkyl für eine Alkylgruppe steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen stehen, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind, wobei die Bedingungen so gewählt sind, dass bei Temperaturen unter 200 °C und Atmosphärendruck keine explosiven Stoffe entstehen und die Verbindung bestehend aus linearen Peptiden und daran gebundenen erfindungsgemäßen Abgangsgruppen bei diesen Bedingungen nicht hydrolytisch gespalten werden,



(IV)

20 mit

A = O, S, und

Z = O, S,

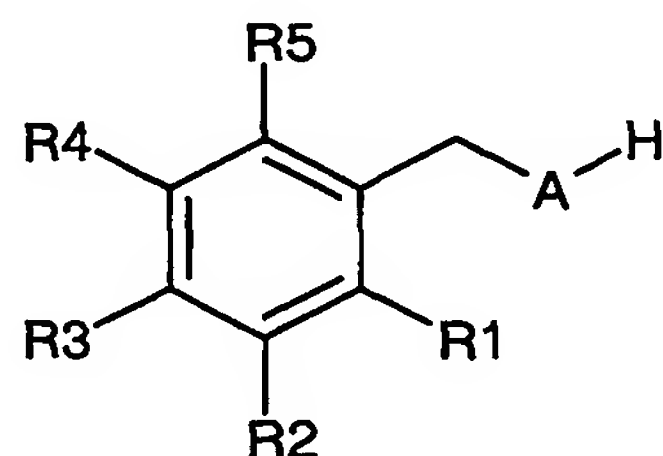
sowie R1, R2, und R3, die unabhängig voneinander sind:

-NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₂Cl, -SO₃H, -H, -NH₃⁺, -NL₃⁺, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O⁻, -NL₂, -NH₂, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO₂⁻, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

wobei

30 L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl

für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear oder verzweigt sind, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, Heteroalkyl für eine Alkylgruppe steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen stehen, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sein können, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind, wobei die Bedingungen so gewählt sind, dass bei Temperaturen unter 200 °C und Atmosphärendruck keine explosiven Stoffe entstehen und die Verbindung bestehend aus linearen Peptiden und daran gebundenen erfindungsgemäßen Abgangsgruppen bei diesen Bedingungen nicht hydrolytisch gespalten werden,



(V)

mit

A = O, S und

sowie R1, R2, R3, R4 und R5, die unabhängig voneinander sind:
 -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₂Cl, -SO₃H, -H, -NH₃⁺, -NL₃⁺, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O⁻, -NL₂, -NH₂, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO₂⁻, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -

Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl,
-Heteroaryl,

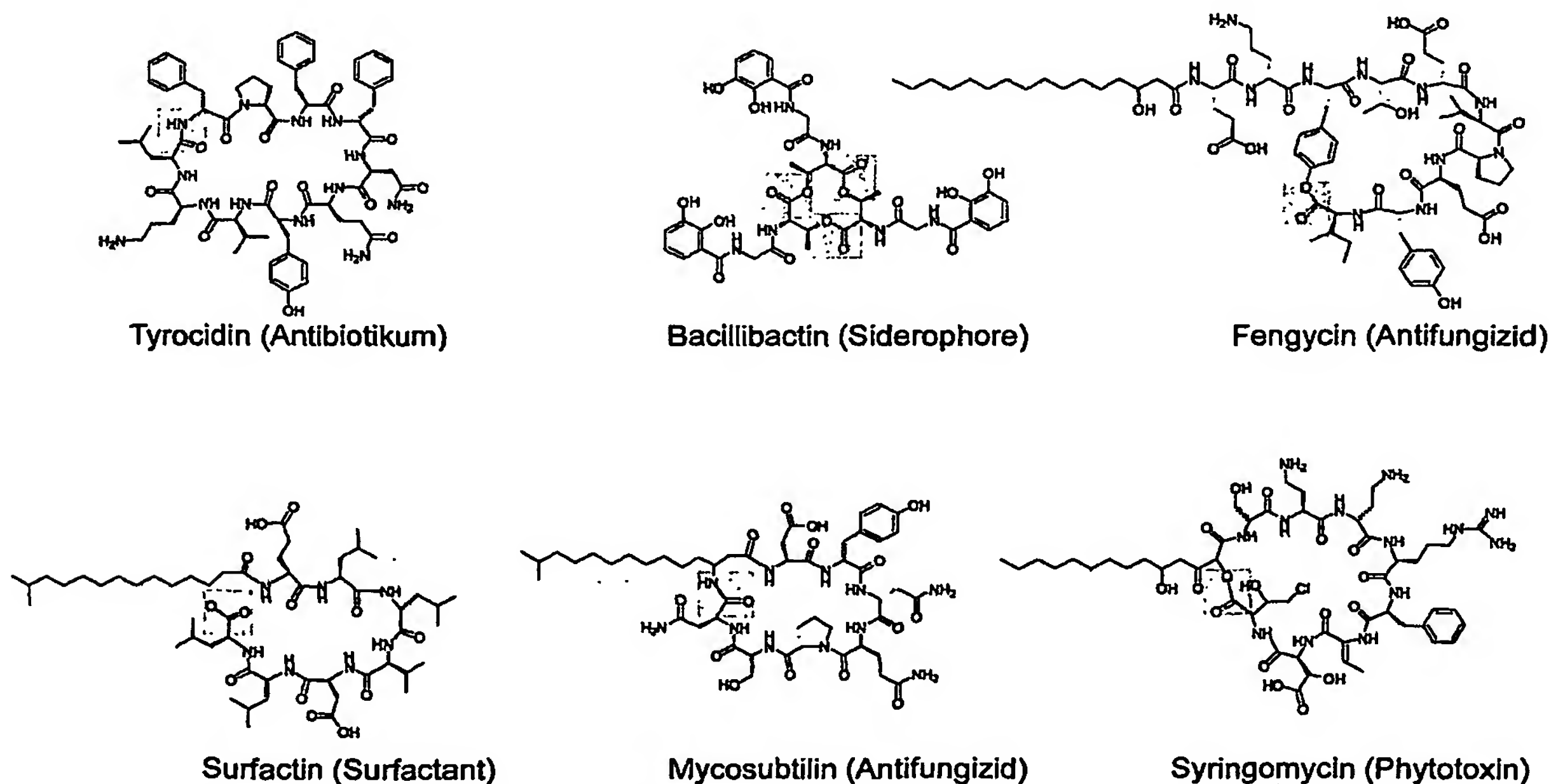
wobei

L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Hetero-
5 alkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl
für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl
für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis
20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear
oder verzweigt sind, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine
10 Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, Heteroalkyl für
eine Alkylgruppe steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome
ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel,
Phosphor ersetzt sind, die heterocyclischen Gruppen für einen
Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen stehen, worin bis zu 5
15 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe
Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, Aryl
für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen
und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest
steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome,
20 ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel,
Phosphor, ersetzt sind, wobei die Bedingungen so gewählt
sind, dass bei Temperaturen unter 200 °C und Atmosphärendruck
keine explosiven Stoffe entstehen und die Verbindung beste-
hend aus linearen Peptiden und daran gebundenen erfindungsge-
25 mäßigen Abgangsgruppen bei diesen Bedingungen nicht hydroly-
tisch gespalten werden,

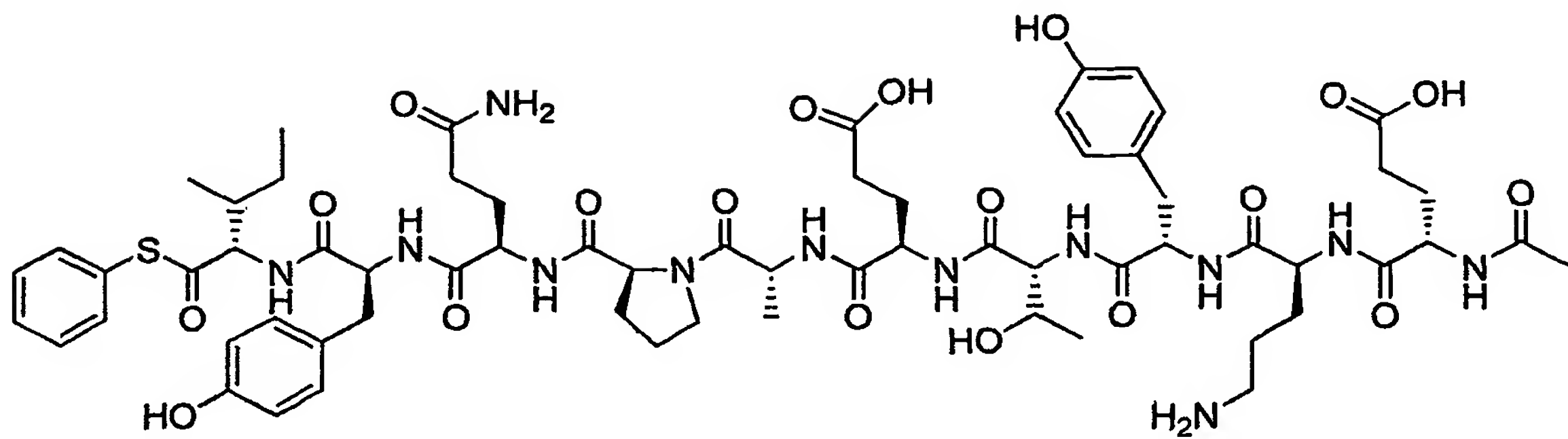
Des weiteren können diese Abgangsgruppen den natürlichen
Kofaktor auch für andere artifizielle Reaktionen *in vitro* mit
30 Enzymen der nichtribosomalen Peptidsynthetasen ersetzen. Eine
solche Reaktion ist die Kondensationsreaktion zur Knüpfung
einer Peptidbindung, katalysiert durch die Kondensationsdomä-
ne (C-Domäne), die auch mit Thioester-gebundenen Substraten
arbeitet.

Überraschend und im Widerspruch zum Stand der Technik wurde
 gefunden, dass die Erkennung eines Substrates durch das
 jeweilige Enzym keine Rolle spielt. Die vorliegende Erfindung
 5 stellt somit eine neue und für den Durchschnittsfachmann
 überraschende Weiterentwicklung des in der US 2002/0192773 A1
 beschriebenen Verfahrens zur enzymatischen Herstellung makro-
 zyklischer Moleküle dar, bei dem gereinigte isolierte Thi-
 oesterase-Domänen (TE-Domänen, Zyklasen) aus einem PKS- oder
 10 NRPS-Multidomänensystem mit einem Substrat umgesetzt werden.
 Bei den in Frage kommenden Substraten handelt es sich um
 lineare Peptide und Lipopeptide mit 5 - 22 monomeren Bauein-
 heiten wie z.B. Aminosäuren. Substrate sind beispielsweise
 Fengycin, Mycosubtilin, Bacillibactin, CDA, Surfactin, Ba-
 15 citracin oder Syringomycin und weitere Substrate, die bereits
 in US 2002/0192773 A1 beschrieben wurden, sowie Pristinamy-
 cin, wobei die genannten Substrate zusätzlich eine erfin-
 dungsgemäße Abgangsgruppe aufweisen. Einige dieser Substrate
 sind nachfolgend dargestellt:

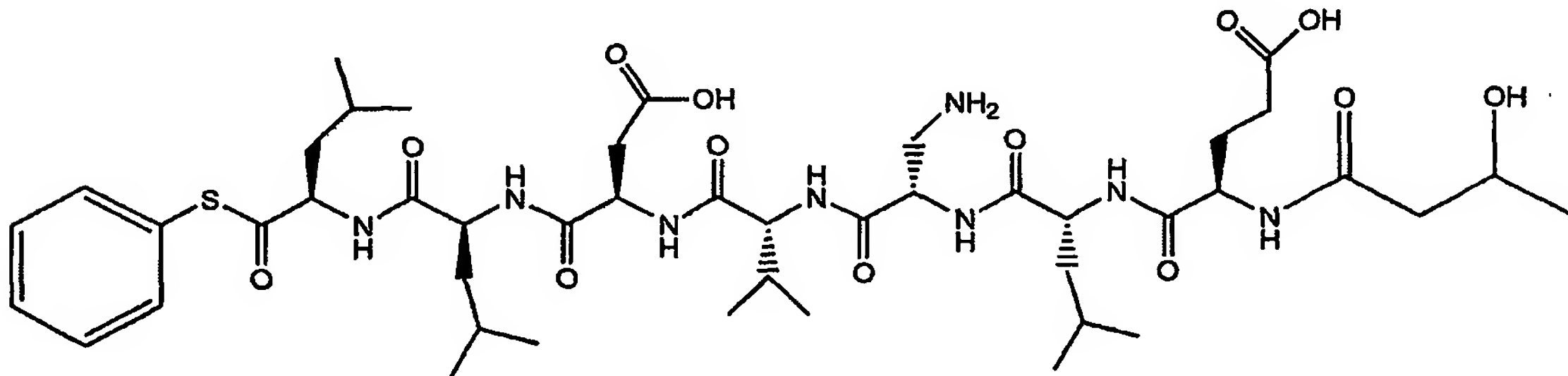
20



Bioaktive Peptide



Struktur eines Fengycin-Thiophenol Substrates



Struktur eines Surfactin-Thiophenol Substrates

5

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt im Vergleich zum Stand der Technik auch bei solchen linearen Peptiden eine Verbesserung dar, die bereits mit dem Fachmann bekannten Methoden zyklisiert werden konnten, da das erfindungsgemäße Verfahren
 10 die Reaktionsgeschwindigkeit der Zyklisierung beschleunigt und / oder zu höheren Ausbeuten des zyklischen Peptids führt.

Bei den in Frage kommenden Enzymen handelt es sich um gereinigte isolierte Thioesterase-Domänen oder Peptid-Zyklasen aus
 15 NRPS- oder PKS-Systemen, wie beispielsweise den entsprechenden Domänen bzw. Zyklasen von Fengycin, Mycosubtilin, Bacil-
 libactin, CDA, Surfactin, Bacitracin, Syringomycin, Tyroci-
 din, Pristinamycin und allen übrigen in US 2002/0192773 A1
 aufgeführten Peptid-Zyklasen, Thioesterasen und gereinigten
 20 isolierten Thioesterasen.

Das lineare Peptid enthält proteinogene und nicht-
 proteinogene Aminosäuren in seinem Rückgrat. Eingebettet in
 dieses Rückgrat können auch Reste und / oder funktionelle

Gruppen sein, die sich nicht von Aminosäuren ableiten wie z.B. gesättigte oder ungesättigte Kohlenstoff-Spacer. Die fakultativ in das Rückgrat eingebetteten Reste und /oder funktionellen Gruppen wurden bereits in US 2002/0192773 A1
5 beschrieben. Die erfindungsgemäße Abgangsgruppe wird dabei entweder an der C-terminalen Carbonsäuregruppe oder einer Seitenketten-Carbonsäure angebracht.

Die erfindungsgemäße Abgangsgruppentechnologie kann zur
10 Herstellung von Stoffbibliotheken für zyklische Peptide und Proteine verwendet werden, indem neue Substratvarianten strukturell bedeutsamer Moleküle (beispielsweise Fengycin, Mycosubtilin, Syringomycin, CDA, etc.), die bisher keine oder nur geringe Aktivität mit der herkömmlichen Abgangsgruppe
15 SNAC zeigten, hergestellt und auf verbesserte biologische Eigenschaften (antibiotisch, antiviral, antifungal, cytostatisch) getestet werden. Die Substratvarianten werden durch kombinatorische Festphasenpeptidsynthese hergestellt und nach der oben aufgeführten allgemeinen Vorschrift mit den neuen
20 Abgangsgruppen versehen. Bevorzugt wird dabei eine Stoffbibliothek für auf Zielzellen angepasste Peptidantibiotika hergestellt, wobei es sich um zyklische Peptidantibiotika handelt, die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens hergestellt wurden.

25

Das erfindungsmäße Verfahren kann zur Herstellung von Zyklisierungs-Kits verwendet werden, die Mittel zur Kopplung erfindungsgemäßer ladungsstabilisierter Abgangsgruppen sowie Peptidzyklasen bereit stellen, so dass lineare Peptide mit
30 den bereit gestellten Abgangsgruppen zunächst zu erfindungsgemäßen Substraten und anschließend mit den bereit gestellten Peptidzyklasen zu zyklischen Peptiden umgesetzt werden können. Dem Hersteller des erfindungsgemäßen Kits ist aus seinem

allgemeinen Wissen bekannt, wie er die einzelnen Komponenten des Kits, z.B. die Puffer, herstellt, formuliert und lagert.

Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten zyklischen Peptide und Proteine können als Arzneimittel für Patienten zur Therapie, Diagnostik und Prophylaxe von Erkrankungen verwendet werden, bei denen bakterielle und / oder virale Infektionen auftreten. Die erfindungsgemäßen zyklischen Peptide und Proteine können, sofern sie cytostatische und /
oder immunsuppressive Eigenschaften besitzen, ferner als Arzneimittel für Patienten zur Therapie, Diagnostik und Prophylaxe von Tumorerkrankungen sowie in der Transplantationsmedizin verwendet werden. Der Begriff Patient bezieht sich dabei gleichermaßen auf Menschen und Wirbeltiere. Damit
können die Arzneimittel in der Human- und Veterinärmedizin verwendet werden. Pharmazeutisch akzeptable Kompositionen von Verbindungen gemäß den Ansprüchen können als Di- bis Oligomere oder als deren Salze, Ester, Amide oder „Prodrugs“ vorliegen, sofern sie nach zuverlässiger medizinischer Beurteilung keine übermäßige Toxizität, Irritationen oder allergische Reaktionen am Patienten auslösen. Die therapeutisch wirksamen Verbindungen der vorliegenden Erfindung können dem Patienten als Teil einer pharmazeutisch akzeptablen Komposition entweder oral, rektal, parenteral, intravenös, intramuskulär, subkutan, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, intravasculär, intrathekal, intravesikal, topisch, lokal (Puder, Salbe oder Tropfen) oder in Sprayform (Aerosol) verabreicht werden. Die intravenöse, subkutane, intraperitoneale oder intrathekale Gabe kann dabei kontinuierlich mittels einer Pumpe oder Dosiereinheit erfolgen. Dosierungsformen für die örtliche Administration der erfindungsgemäßen Verbindungen schließen Salben, Puder, Zäpfchen, Sprays und Inhalationsmittel ein. Die aktive Komponente wird dabei unter sterilen Bedingungen mit einem physiologisch akzeptablen

Trägerstoff und möglichen Preservativen, Puffern, Verdünnungs- und Treibmitteln je nach Bedarf vermischt.

[Beispiele]**Ausführungsbeispiel 1: Herstellung und Reinigung des Fengycin-Thiophenol-Substrates sowie Zyklisierung**

5 Das lineare Fengycin-Substrat wird zunächst nach Standardmethoden der Peptidfestphasensynthese hergestellt. Die Peptidsequenz lautet: Acetyl-Glu-D-Orn-Tyr-D-Thr-Glu-D-Ala-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-COOH. Im nächsten Schritt werden 0,05 mMol des Peptides mit 0,1 mMol DCC, 0,1 mMol HOBt und 0,5 mMol Thiophenol versetzt und in 2 ml THF gelöst. Das Gemisch rührt
10 für 30 min bei RT, und 0,05 mMol Kaliumkarbonat werden addiert. Das Gemisch rührt für weitere 2,5 h bei RT, und darauf wird durch Filtration festes DCH abgetrennt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Entschützung der
15 Peptidseitenketten erfolgt für 3 h in 2 ml 95% TFA, 2,5% Wasser und 2,5% Triisopropylsilan. Das Gemisch wird dann in 50 ml eiskalten Diethylether geschüttet und der entstehende Feststoff durch Zentrifugation abgetrennt. Die Reinigung des Feststoffs erfolgt mittels präparativer HPLC mit einer C₁₈-
20 Nucleodursäule (Porengröße 100 Å, Partikelgröße 7 µm, Durchmesser 10 mm, Länge 250 mm, Macherey-Nagel) mit einem Gradienten von 10% Acetonitril in Wasser/0,1 % TFA auf 70 % Acetonitril in Wasser/0,1% TFA in 40 min bei einer Flussrate von 6 ml/min. Die Retentionszeit des zyklisierten Fengycins
25 (vgl. Fig. 1) beträgt 19 min. Die Ausbeute beträgt zwischen 70 und 80 %.

Die Produkte werden mit LC-MS und MALDI-TOF Massenspektrometrie auf Reinheit und Identität überprüft.

Die Zyklisierung des linearen Fengycin-Thiophenol-Substrates
30 erfolgt in einem wässrigen Zyklisierungspuffer bestehend aus 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES, 25 mM) und Natriumchlorid (NaCl, 50 mM) bei pH 7 in einem Gesamtvolumen von 50 µL. Die Substratkonzentration beträgt 100 µM für Standardzyklisierungsreaktionen. Die Zyklisie-

rungsreaktion wird durch Zugabe von rekombinanter Fengycin TE bei einer Endkonzentration von 5 μM initiiert und durch Zugabe von 35 μL 4%-iger Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser nach 4 Stunden gestoppt. Im Anschluss werden die Reaktions-
5 produkte mittels HPLC mit einer C_{18} -Nucleodursäule (Porengröße 100 Å, Partikelgröße 3 μM , Durchmesser 10 mm, Länge 250 mm, Macherey-Nagel) und einem Gradienten von 30 % Acetonitril in Wasser / 0,1 % TFA auf 60 % Acetonitril in Wasser / 0,1 % TFA in 35 min bei einer Flussrate von 0,4 mL/min bei 40 °C
10 untersucht. Die Identität der Produkte wird durch ESI-Massenspektrometrie bestätigt. Zyklisiertes Fengycin kann mittels präparativer HPLC rein dargestellt werden.

Ausführungsbeispiel 2: Herstellung und Reinigung des Fengycin-Benzylmercaptan-Substrates sowie Zyklisierung

Herstellung, Reinigung und Zyklisierung des Fengycin-Benzylmercaptan-Substrates erfolgten analog zu Ausführungsbeispiel 1, wobei in Ausführungsbeispiel 2 0,05 mMol Benzylmercaptan an Stelle von 0,05 mMol Thiophenol eingesetzt
20 werden. Die Ausbeute des zyklisierten Fengomycins beträgt etwa 70 %.

Ausführungsbeispiel 3: Herstellung und Reinigung weiterer Fengycin- Substrate sowie Zyklisierung

25 Fengycin wird wie unter Ausführungsbeispiel 1 und 2 beschrieben mit weiteren erfindungsgemäßen Abgangsgruppen umgesetzt. Dabei handelt es sich um 2-Mercaptopyridin, p-Nitrothiophenol und Pentafluorthiophenol. Die Zyklisierung dieser Fengycin-
30 Substrate erfolgt analog zu Ausführungsbeispiel 1 und ergibt deutlich höhere Anteile an nicht enzymatisch katalysiertem Zyklisierungsprodukt bzw. hydrolysiertem Produkt als im Falle der Verwendung von Thiophenol bzw. Benzylmercaptan.

Tabelle 1.

Die linearen Peptide Fengycin, Surfactin, CDA und Syringomycin werden wie unter Ausführungsbeispiel 1 beschrieben mit Thiophenol umgesetzt und anschließend enzymatisch zyklisiert.

- 5 Tab. 1 zeigt die Ergebnisse der massenspektrometrischen Messung der erhaltenen erfindungsgemäßen Substrate.

Verbindung	Spezies	Ionisations- methode	Beobachtete Masse (berechnete Masse) (Da)
Fengycin- Thiophenol	$[M+H]^+$	ESI	1361,40 (1361,60)
Surfactin- Thiophenol	$[M+H]^+$	ESI	965,40 (965,49)
CDA- Thiophenol	$[M+H]^+$	ESI	1519,30 (1519,5)
Syringomycin- Thiophenol	$[M+H]^+$	ESI	1175,60 (1175,54)

[Abbildungslegenden]

Fig. 1: HPLC der Reaktion von Fengycin-Thiophenol mit der Fengycin-Peptidzyklase

5

HPLC-MS mit einer reversed phase C₁₈ Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, Porendurchmesser:100 Å, Partikelgröße:3 µm) mit dem folgenden Gradienten: 0-35 min, 30-60 % Acetonitril/0.1 % TFA in Wasser/0.1 % TFA; 0.4 mL/min, 40°C.

10 1 zeigt die Kontrollreaktion mit einem mutierten (inaktivierten) Enzym. 2 zeigt die Inkubation mit dem nativen Enzym (aktiv). Su = Substrat, Cy = zyklisches Produkt, Hy = hydrolysiertes Produkt.

15 **Fig. 2: HPLC der Reaktion von Surfactin-Thiophenol mit der Surfactin-Peptidzyklase**

HPLC-MS mit einer reversed phase C₁₈ Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, Porendurchmesser:100 Å, Partikelgröße:3 µm) mit dem folgenden Gradienten: 0-35 min, 30-60 % Acetonitril/0.1 % TFA in Wasser/0.1 % TFA; 0.4 mL/min, 40°C.

20 1 zeigt die Kontrollreaktion ohne Enzym. 2 zeigt die Inkubation mit dem nativen Enzym (aktiv). Su = Substrat, Cy = zyklisches Produkt, Hy = hydrolysiertes Produkt, (Cy) nicht enzymatisch katalysierte Zyklisierung über eine Amino Seiten-
25 gruppe in der Peptidsequenz an Position 3 (Dap).

Fig. 3: Fengycin-Peptidzyklase

5 µM der rekombinanten Fengycin-Peptidzyklase, die in vorher-
30 gehenden Untersuchungen keine Zyklisierungsaktivität mit konventionellen SNAC-Substraten zeigte, wird mit 100 µM Fengycin-Thiophenol für 10, 30, 40, 50, 60 min bei Raumtemperatur in 25 mM HEPES, 50 mM NaCl bei pH 7 in 50 µL Gesamtvolumen inkubiert. Mit dieser Messung wird der lineare Bereich

für weitere kinetische Studien ermittelt. Die Reaktionen werden durch Zugabe von 35 μL TFA (4 % in Wasser) gestoppt und auf der analytischen HPLC mit einer C_{18} -Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, Porendurchmesser: 100 Å, Partikelgröße: 3 μm) mit dem folgenden Gradienten untersucht: 0-35 min, 30-60 % Acetonitril/0.1 % TFA in Wasser/0.1 % TFA; 0.4 mL/min, 40°C.

Kinetische Untersuchungen werden zu verschiedenen Zeitpunkten bei Substrat-Konzentrationen von 50 μM bis 1000 μM durchgeführt und die kinetischen Größen K_M und k_{cat} aus der Lineweaver-Burk-Auftragung entnommen. Für Fengycin-Thiophenol ergibt sich für die Zyklisierungsreaktion ein K_M von 461 μM und ein k_{cat} von 0,33 min^{-1} .

15 **Fig. 4: Surfactin-Peptidzyklase**

Im Falle der Surfactin-Peptidzyklase existieren kinetische Referenzdaten mit einem SNAC-Substrat. Im Falle von Surfactin-Thiophenol wird für die Zyklisierungsreaktion ein K_M von 126 μM und ein k_{cat} von 5,6 min^{-1} bestimmt, was einem k_{cat}/K_M Wert von 0,04 $\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ entspricht. Verglichen damit ist die kinetische Effizienz von Surfactin-SNAC, repräsentiert durch den k_{cat}/K_M Wert 0,0029 $\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$, 14 mal niedriger als mit Surfactin-Thiophenol.

25 **Fig. 5: CDA-Peptidzyklase**

Ein ähnliches Ergebnis erhält man für die Zyklisierung von CDA-Thiophenol mit der „Calcium Dependent Antibiotic“ Peptidzyklase (CDA). Der K_M Wert für das Thiophenol-Substrat beträgt 10,7 μM , und der k_{cat} Wert beläuft sich auf 0,21 min^{-1} . Die kinetische Effizienz des Thiophenol-Substrates mit einem k_{cat}/K_M Wert von 0,02 $\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ ist zehnfach größer verglichen mit dem k_{cat}/K_M Wert von dem SNAC Substrat ($k_{\text{cat}}/K_M = 0,0021 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$).

Fig. 6: Syringomycin-Peptidzyklase

Im Falle der Syringomycin-Peptidzyklase existieren keine kinetischen Referenzdaten mit einem SNAC-Substrat, da dies in vorhergehenden Experimenten keine Aktivität zeigte. Im Falle von Syringomycin-Thiophenol wird für die Zyklisierungsreaktion ein K_M von 32,9 μM und ein k_{cat} von 0,805 min^{-1} bestimmt, was einem k_{cat}/K_M Wert von 0,024 $\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ entspricht.

Fig. 7: HPLC der Reaktion von Surfactin-2-Thiokresol mit der Surfactin-Peptidzyklase

HPLC-MS mit einer reversed phase C_{18} Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, Porendurchmesser:100 Å, Partikelgröße:3 μm) mit dem folgenden Gradienten: 0-35 min, 30-60 % Acetonitril/0.1 % TFA in Wasser/0.1 % TFA; 0.4 mL/min, 40°C. 1 zeigt die Kontrollreaktion mit einem mutierten (inaktivierten) Enzym. 2 zeigt die Inkubation mit dem nativen Enzym (aktiv). Su = Substrat, Cy = zyklisches Produkt, Hy = hydrolysiertes Produkt.

20

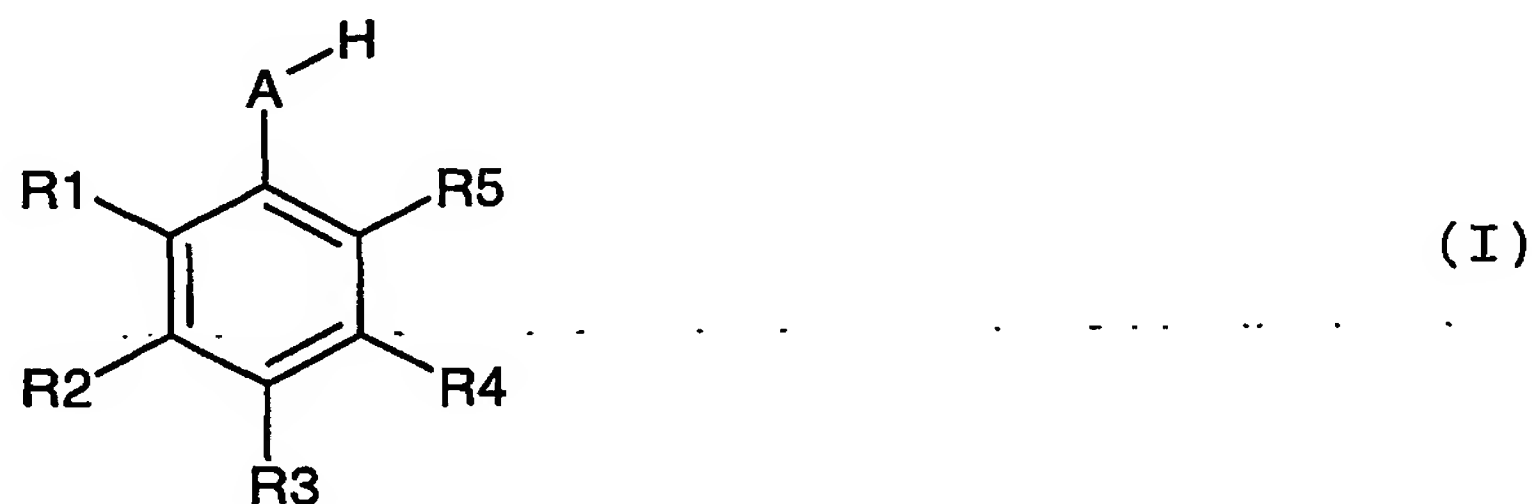
Fig. 8: HPLC der Reaktion von Surfactin-4-Methoxyphenylthiol mit der Surfactin-Peptidzyklase

HPLC-MS mit einer reversed phase C_{18} Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, Porendurchmesser:100 Å, Partikelgröße:3 μm) mit dem folgenden Gradienten: 0-35 min, 30-60 % Acetonitril/0.1 % TFA in Wasser/0.1 % TFA; 0.4 mL/min, 40°C. 1 zeigt die Kontrollreaktion mit einem mutierten (inaktivierten) Enzym. 2 zeigt die Inkubation mit dem nativen Enzym (aktiv). Su = Substrat, Cy = zyklisches Produkt, Hy = hydrolysiertes Produkt.

[Patentansprüche]

1. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide, bei dem
- eine Peptidzyklase mit einem linearen Peptid in Kontakt
5 gebracht wird,
 - das lineare Peptid einen Acylrest enthält, der durch eine chemisch mit diesem Acylrest verbundene nucleophile Abgangsgruppe aktiviert ist,
 - der aktivierte Acylrest des linearen Peptids das Zentrum
10 der Peptidzyklase selektiv acyliert, wobei die nucleophile Abgangsgruppe unter Bildung des zyklischen Peptids abgespalten wird und
 - zyklische Peptide mit Ringen aus mindestens 5 Atomen gebildet werden,
- 15 dadurch gekennzeichnet, dass
- die nucleophile Abgangsgruppe, die mit dem Acylrest des linearen Peptids chemisch verbunden ist und diesen aktiviert, ladungsstabilisiert ist und
 - die ladungsstabilisierte Abgangsgruppe an die Acylgruppe
20 der C-terminalen Carbonsäuregruppe des Peptids gebunden ist.
2. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den ladungsstabilisierten Abgangsgruppen um aromatische, heteroaromatische oder araliphatische Verbindungen handelt, bei
25 denen eine Hydroxy- oder Thiogruppe an eines der Ringatome oder an ein an das Ringsystem gebundenes Kohlenstoffatom gebunden ist.
3. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem
30 der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Peptidzyklase um eine NRPS- oder PKS-Zyklase handelt, bevorzugt um eine gereinigte isolierte Thioesterase-Domäne.

4. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das lineare Peptid in seinem Rückgrat proteinogene und / oder nicht proteinogene Aminosäuren enthält, wobei in das Rückgrat auch Reste eingebettet sein können, die sich nicht von Aminosäuren ableiten.
- 5
5. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der ladungsstabilisierten Abgangsgruppe um eine
- 10 Verbindung der Formel



handelt, wobei gilt:

A = O, S

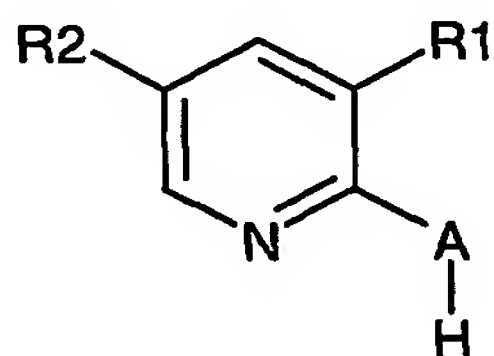
- 15 und wobei R1, R2, R3, R4 und R5 unabhängig voneinander sind:
 -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₂Cl, -SO₃H, -H, -NH₃⁺, -NL₃⁺, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O⁻, -NL₂, -NH₂, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO₂⁻, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl,
 20 -Heteroaryl,

wobei

- L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear oder verzweigt sind, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, Heteroalkyl für eine Alkylgruppe steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome
- 25

ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen stehen, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind.

6. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der ladungsstabilisierten Abgangsgruppe um eine Verbindung der Formel



(II)

handelt, wobei gilt:

A = O, S

und wobei R1 und R2 unabhängig voneinander sind:

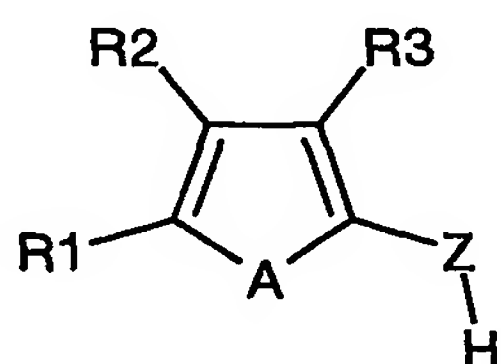
-NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₂Cl, -SO₃H, -H, -NH₃⁺, -NL₃⁺, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O⁻, -NL₂, -NH₂, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO₂⁻, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

wobei

L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear

oder verzweigt sind, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, Heteroalkyl für eine Alkylgruppe steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen stehen, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind.

7. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der ladungsstabilisierten Abgangsgruppe um eine Verbindung der Formel



(III)

20

handelt, wobei gilt:

A = O, S und

Z = O, S,

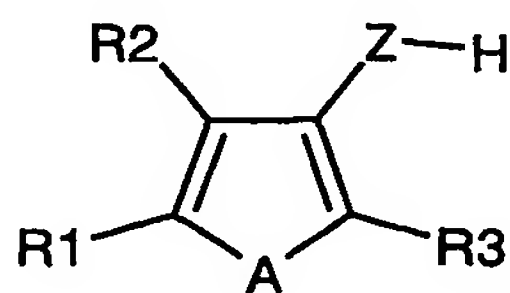
und wobei R1, R2, und R3 unabhängig voneinander sind:

-NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₂Cl, -SO₃H, -H, -NH₃⁺, -NL₃⁺, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O⁻, -NL₂, -NH₂, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO₂⁻, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

30 wobei

L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear oder verzweigt sind, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, Heteroalkyl für eine Alkylgruppe steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen stehen, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind.

8. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der ladungsstabilisierten Abgangsgruppe um eine Verbindung der Formel



(IV)

25

handelt, wobei gilt:

A = O, S und

Z = O, S,

und wobei R1, R2, und R3 unabhängig voneinander sind:

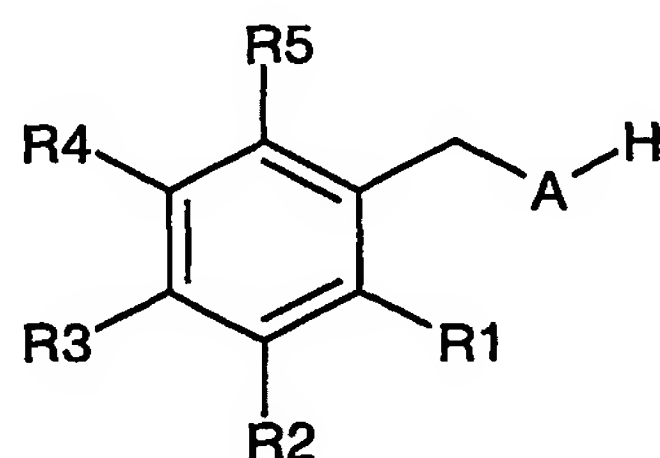
-NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₂Cl, -SO₃H, -H, -NH₃⁺, -NL₃⁺, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O⁻, -NL₂, -NH₂, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -

OC(=O)L, -SL, -CO₂⁻, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

wobei

- 5 L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear
10 oder verzweigt sind, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, Heteroalkyl für eine Alkylgruppe steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, die heterocyclischen Gruppen für einen
15 Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen stehen, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest
20 steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind.

9. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem
25 der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der ladungsstabilisierten Abgangsgruppe um eine Verbindung der Formel



(V)

handelt, wobei gilt:

A = O, S

und wobei R1, R2, R3, R4 und R5 unabhängig voneinander sind:

-NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₂Cl, -SO₃H, -H, -NH₃⁺, -NL₃⁺,
5 -C(=O)L, -C(=O)Het, -O⁻, -NL₂, -NH₂, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -
OC(=O)L, -SL, -CO₂⁻, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -
Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl,
-Heteroaryl,

wobei

10 L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Hetero-
alkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl
für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl
für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis
20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear
15 oder verzweigt sind, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine
Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, Heteroalkyl für
eine Alkylgruppe steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome
ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel,
Phosphor ersetzt sind, die heterocyclischen Gruppen für einen
20 Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen stehen, worin bis zu 5
Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe
Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, Aryl
für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen
und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest
25 steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome,
ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel,
Phosphor, ersetzt sind.

10. Verfahren zur Herstellung eines Substrates und anschlie-
30 ßende Umsetzung dieses Substrates mit Peptid-Zyklasen zu
einem zyklischen Peptid, wobei die Substrate lineare Pep-
tide sind, dadurch gekennzeichnet, dass nacheinander fol-
gende Schritte ausgeführt werden:

- Versetzen der freien Peptidsäure mit einem den C-Terminus der Peptidsäure aktivierenden Reagenz, einem Kupplungsadditiv und einer ladungsstabilisierten Abgangsgruppe in einem Lösungsmittel
 - 5 - Rühren bei Raumtemperatur,
 - Zugabe einer Base und weiteres Rühren bei Raumtemperatur,
 - Filtrieren,
 - Entfernen des Lösungsmittels,
 - 10 - Entschützen des Peptids,
 - Zugabe einer Peptid-Zyklase,
 - Reinigung des erhaltenen zyklischen Peptids.
11. Verfahren zur Herstellung eines Substrates und anschließende Umsetzung dieses Substrates mit Peptid-Zyklasen zu
- 15 einem zyklischen Peptid gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Acylgruppe der C-terminalen Aminosäure des linearen Peptids an eine Abgangsgruppe nach einem der Ansprüche 5 bis 9 gebunden ist.
12. Verfahren zur Herstellung eines Substrates und anschließende Umsetzung dieses Substrates mit Peptid-Zyklasen zu
- 20 einem zyklischen Peptid gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Abgangsgruppe einen pK_A -Wert kleiner oder gleich 10, bevorzugt kleiner oder gleich 8 besitzt.
13. Verfahren zur Herstellung eines Substrates und anschließende Umsetzung dieses Substrates mit Peptid-Zyklasen zu
- 25 einem zyklischen Peptid gemäß nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass als Aktivierungsreagenz für den freien C-Terminus oder eine Seitenketten-Carbonsäure der Peptidcarbonsäure DCC, DCI, PyClop, HBTU,
- 30 HATU, HOSu, TBTU, T3P, BopCl oder 3-Cl-1-Pyridiniumiodid verwendet wird.
14. Verfahren zur Herstellung eines Substrates und anschließende Umsetzung dieses Substrates mit Peptid-Zyklasen zu

einem zyklischen Peptid gemäß einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass als Kupplungsadditiv HOBt, HOAt oder HONB verwendet wird.

15. Verwendung von zyklischen Peptiden gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Herstellung eines Medikamentes zur Therapie, Diagnostik und Prophylaxe von Erkrankungen, bei denen bakterielle Infektionen auftreten.

16. Verwendung von ladungsstabilisierten Abgangsgruppen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 in einem Kit zur Herstellung zyklischer Peptide.

Fig. 1:

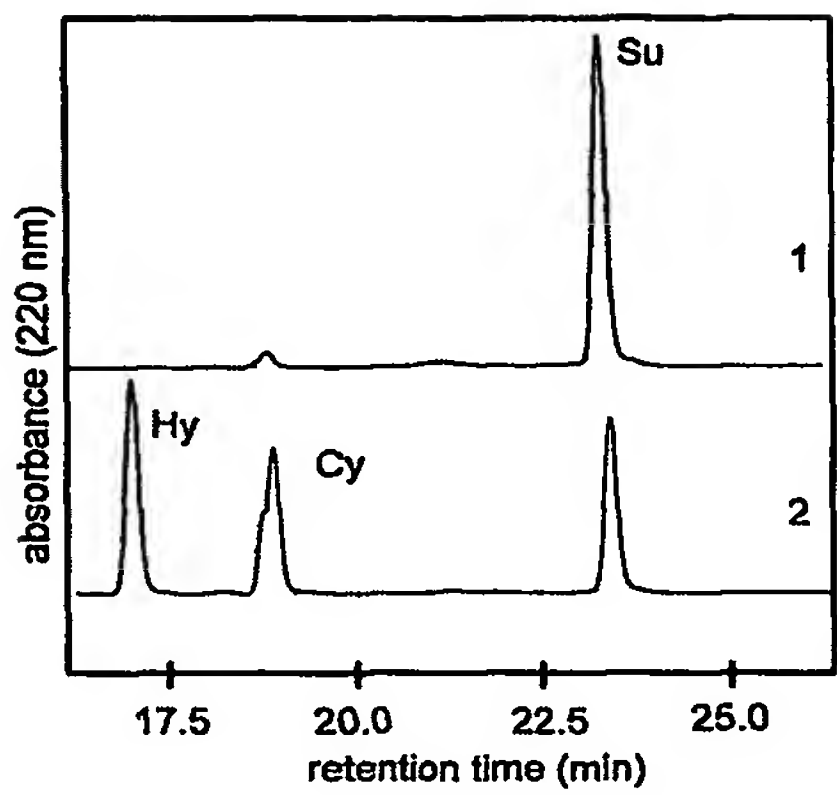


Fig. 2:

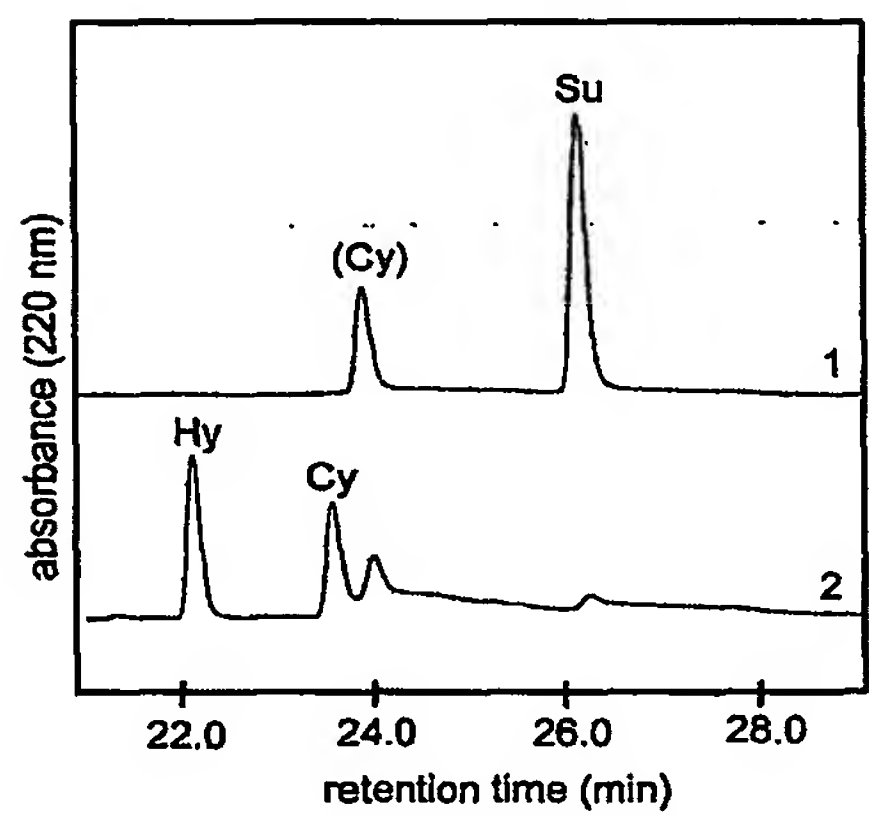


Fig. 3:

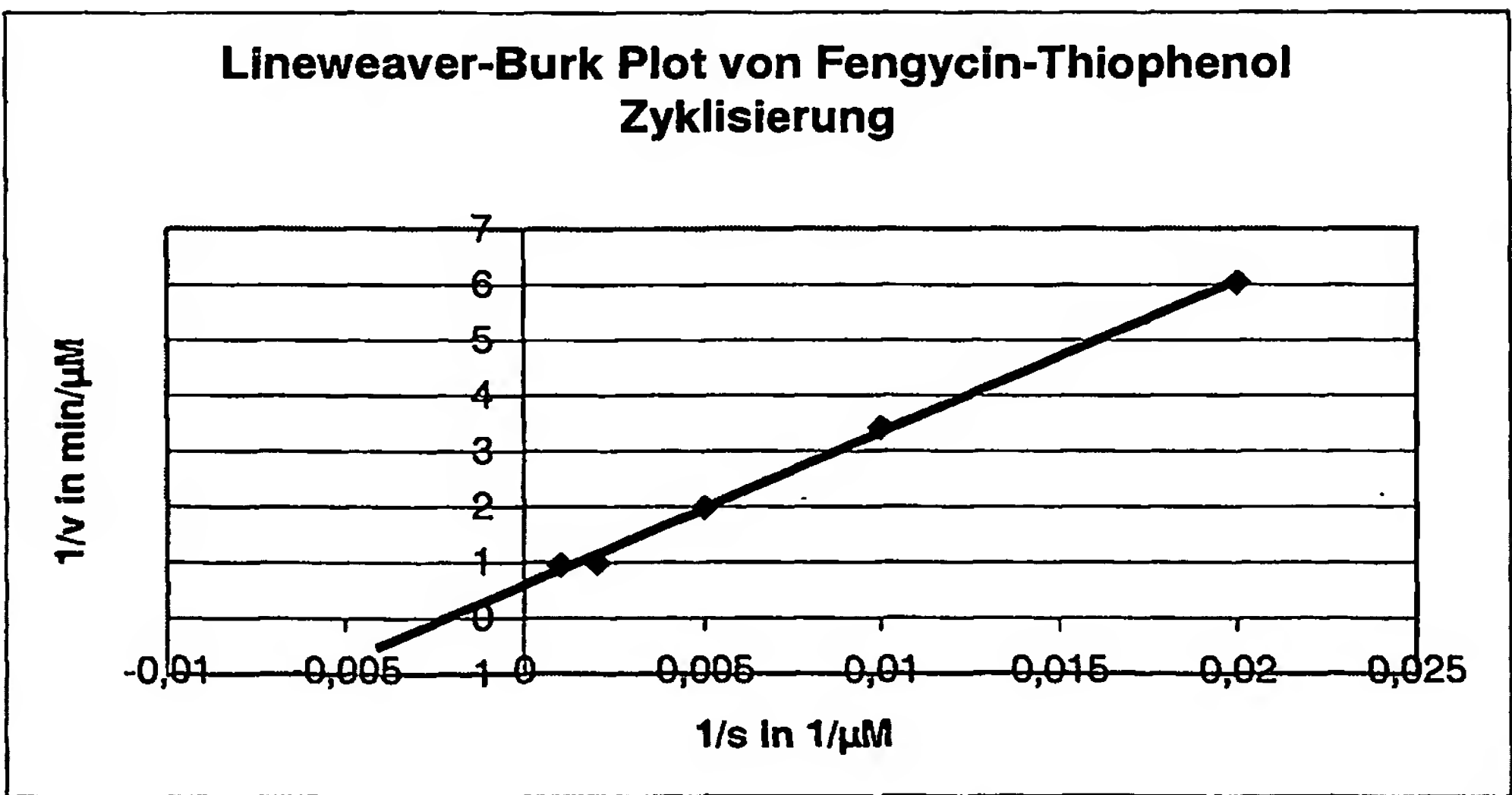


Fig. 4:

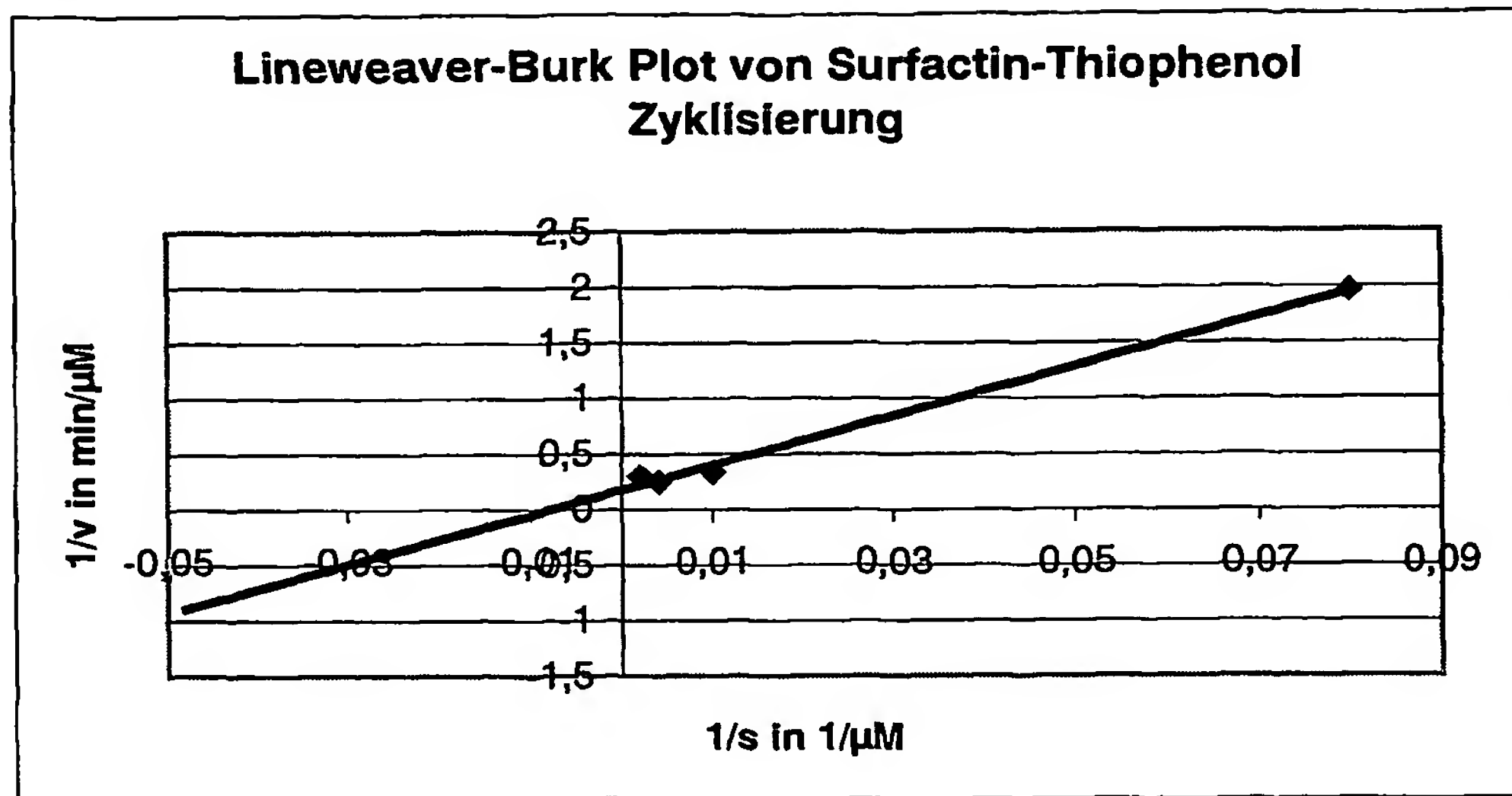


Fig. 5:

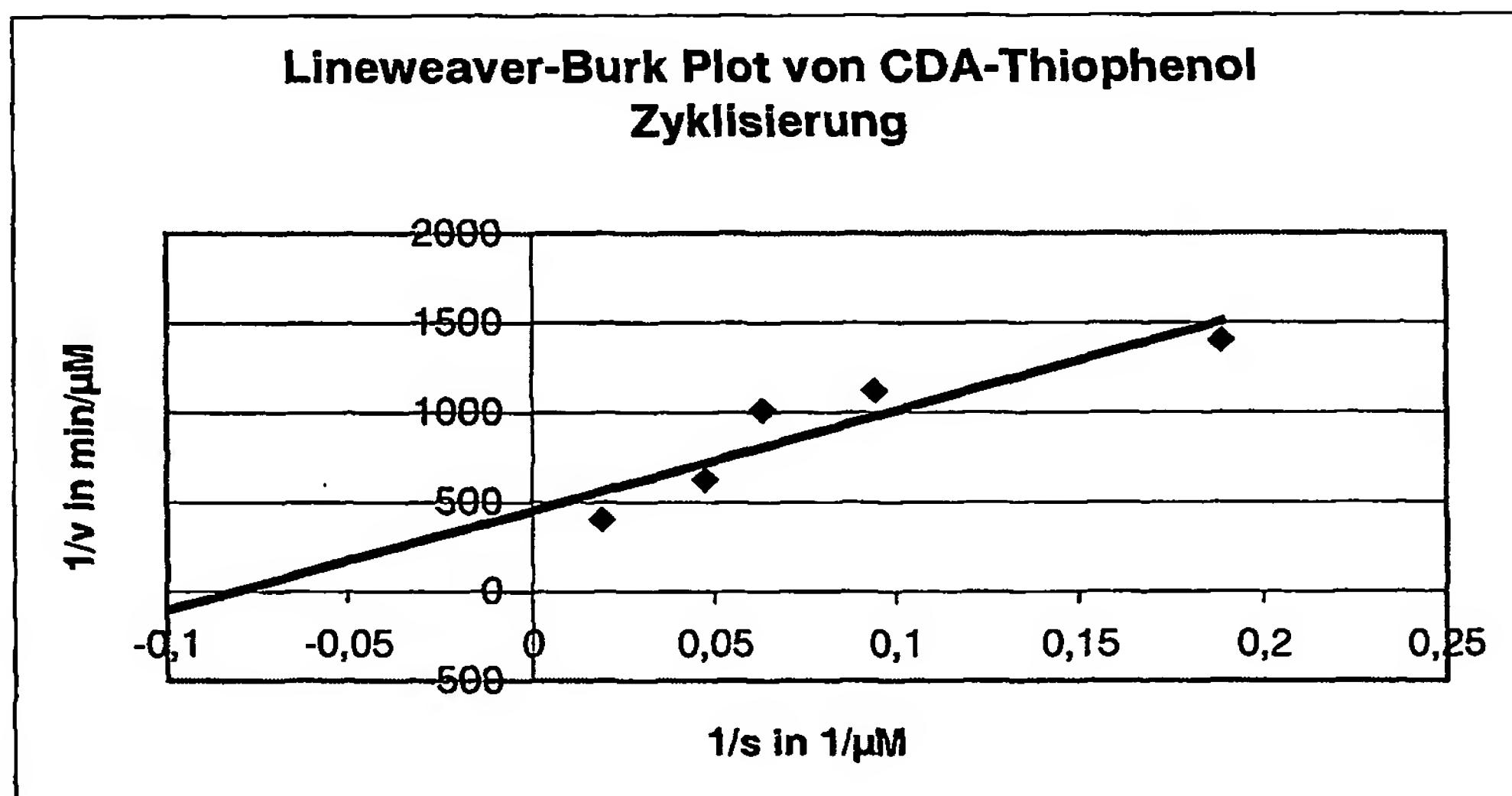
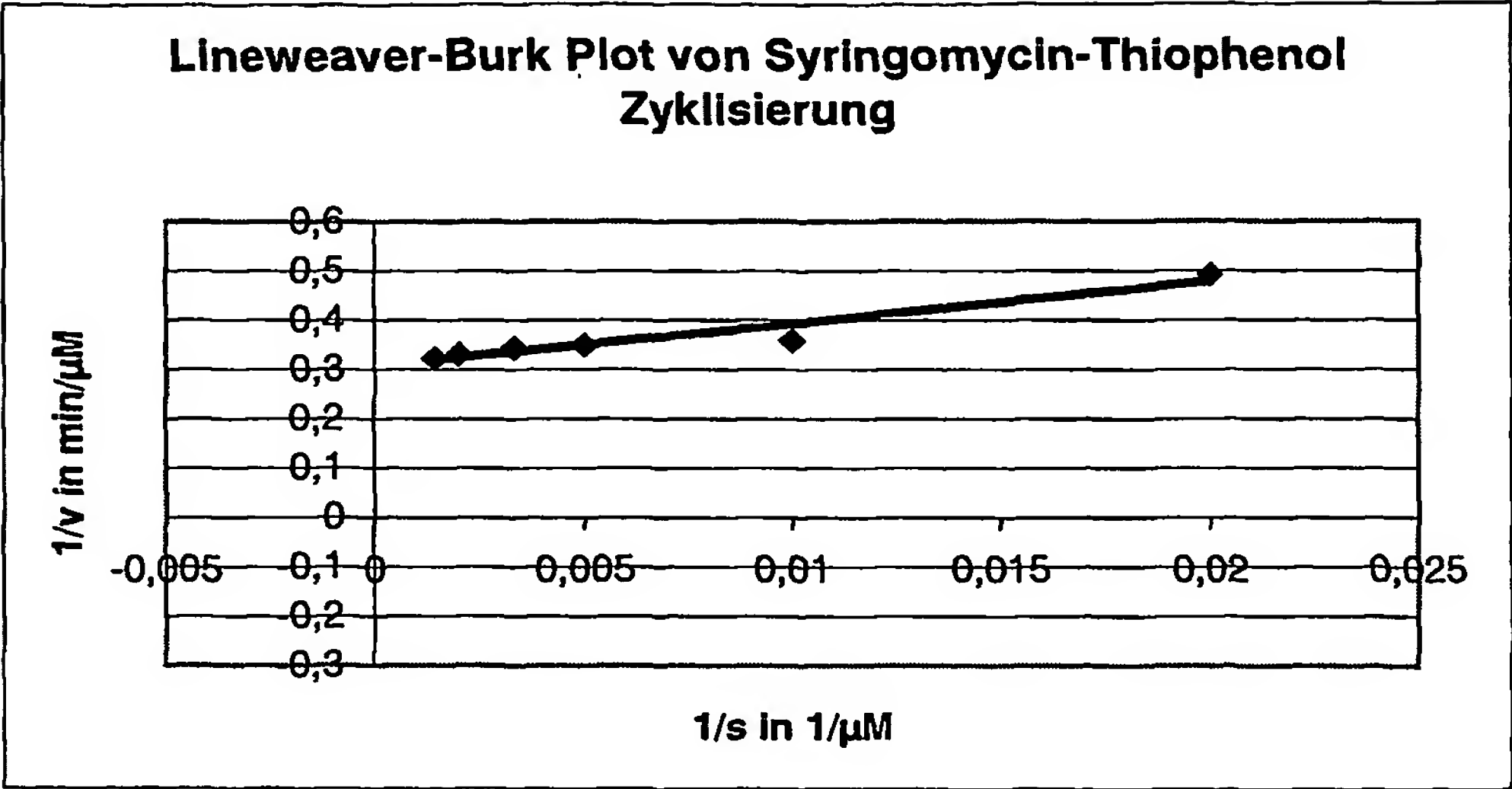


Fig. 6:



5

Fig. 7:

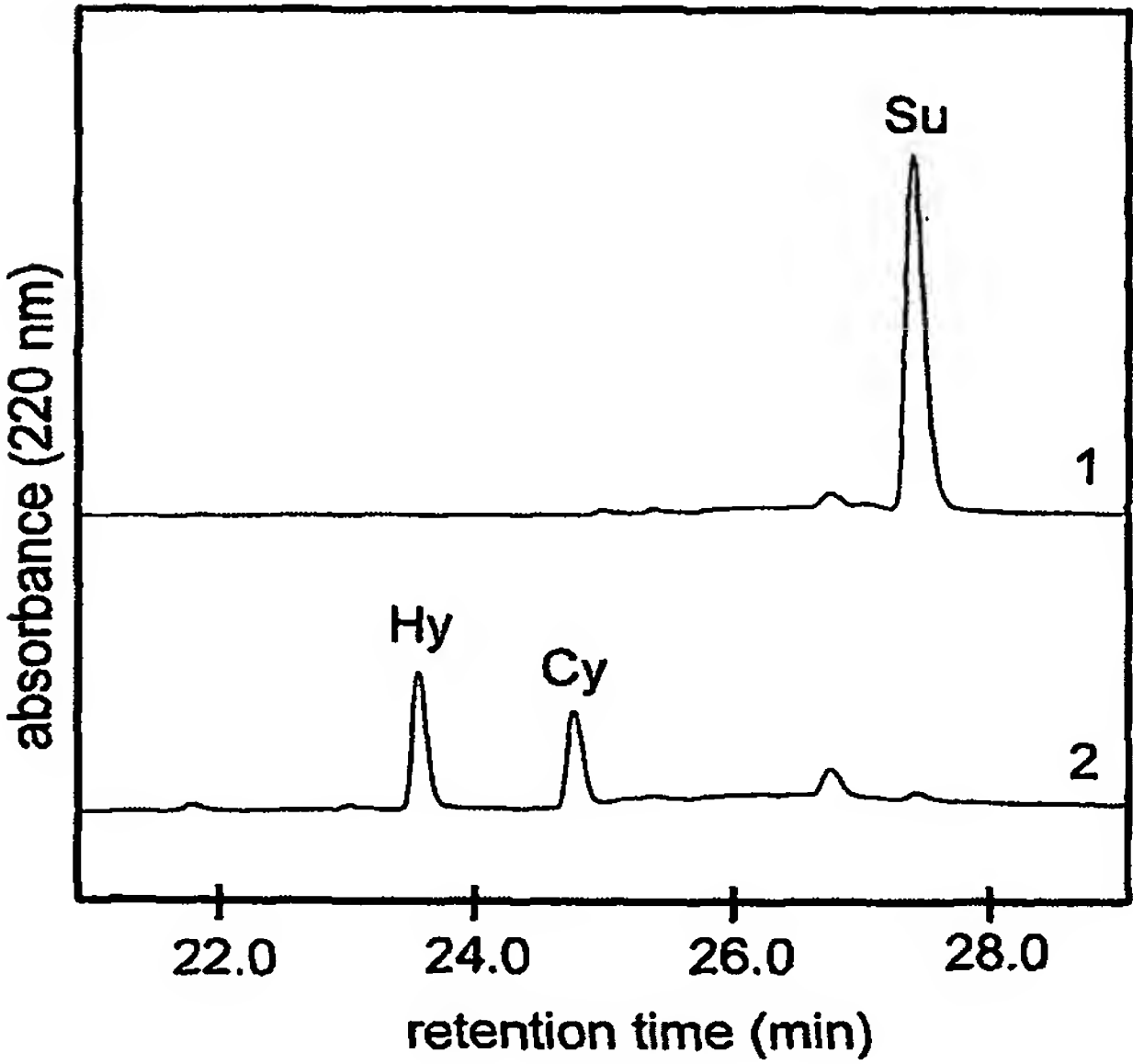
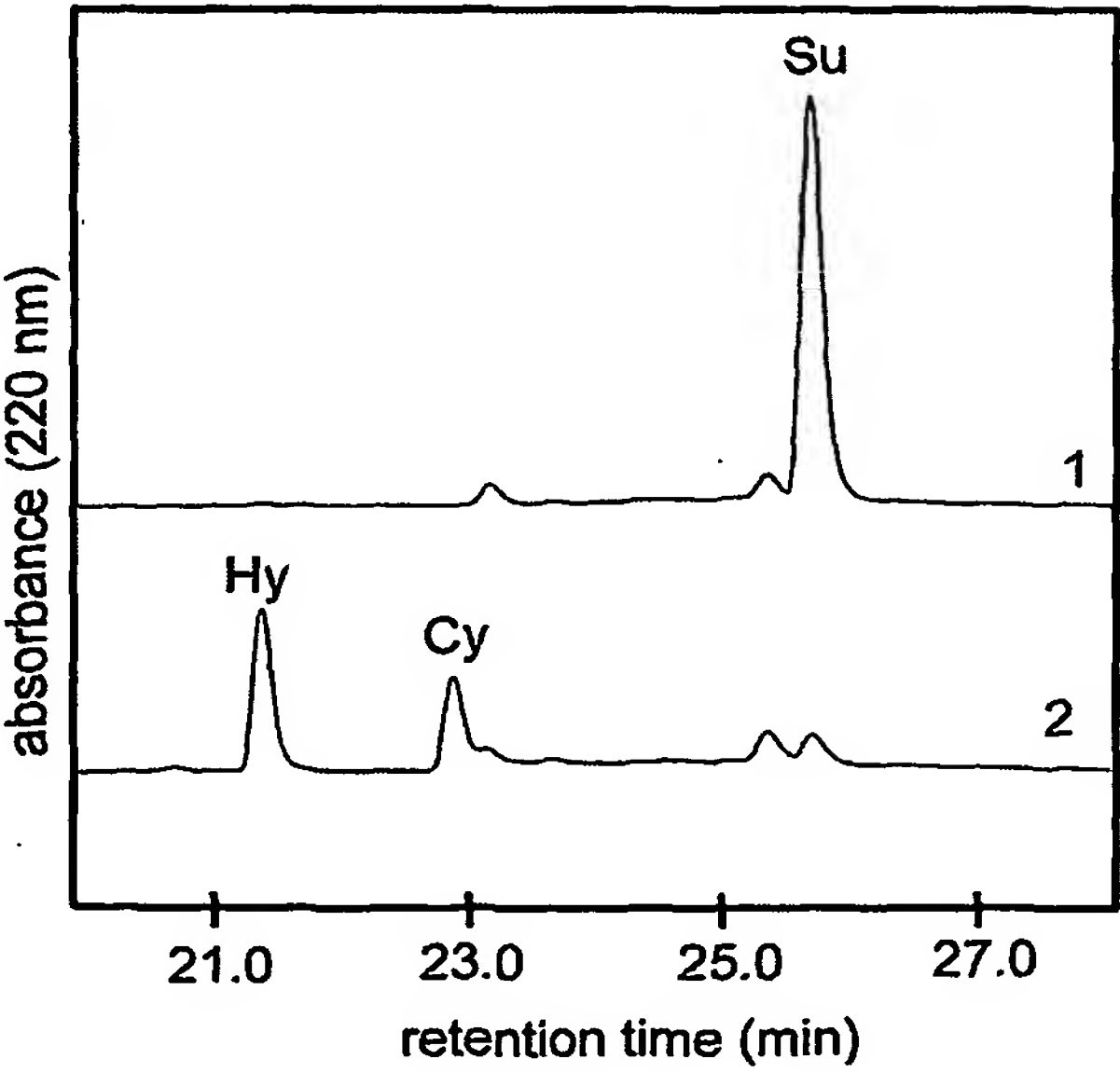


Fig. 8:



A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12P21/00 C07K1/107 C07K5/12 C07K7/06 C07K7/50
C07K7/64 A61K38/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CAB Data, Sequence Search, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/05815 A (LILLY CO ELI ; KREUZMAN ADAM JOSEPH (US); KULANTHAIVEL PALANIAPPAN (US) 25 January 2001 (2001-01-25) claims 1-11	15
X	WO 02/085401 A (HONG TERESA B ; WARING ALAN J (US); LEHRER ROBERT I (US); UNIV CALIFOR) 31 October 2002 (2002-10-31) page 15, line 9 - page 18, line 5; claims 1-19	15
A	US 2002/192773 A1 (MARAHEIL MOHAMMED A ET AL) 19 December 2002 (2002-12-19) cited in the application the whole document	

--/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 November 2004

Date of mailing of the international search report

23/11/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOHLI RAHUL M ET AL: "Generality of peptide cyclization catalyzed by isolated thioesterase domains of nonribosomal peptide synthetases" BIOCHEMISTRY, vol. 40, no. 24, 19 June 2001 (2001-06-19), pages 7099-7108, XP002304805 ISSN: 0006-2960 the whole document -----	
A	TSENG CLAIRE C ET AL: "Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase." BIOCHEMISTRY, vol. 41, no. 45, 12 November 2002 (2002-11-12), pages 13350-13359, XP002304806 ISSN: 0006-2960 the whole document -----	
A	KEATING T A ET AL: "Chain termination steps in nonribosomal peptide synthetase assembly lines: directed acyl-S-enzyme breakdown in antibiotic and siderophore biosynthesis." CHEMBIOCHEM : A EUROPEAN JOURNAL OF CHEMICAL BIOLOGY. 2 FEB 2001, vol. 2, no. 2, 2 February 2001 (2001-02-02), pages 99-107, XP002304807 ISSN: 1439-4227 the whole document -----	
A	WO 98/28434 A (SCRIPPS RESEARCH INST ; BARK STEVEN J (US); CANNE LYNNE (US); DAWSON P) 2 July 1998 (1998-07-02) cited in the application the whole document -----	
A	WO 96/34878 A (SCRIPPS RESEARCH INST ; DAWSON PHILIP E (US); MUIR TOM W (US); KENT ST) 7 November 1996 (1996-11-07) cited in the application the whole document -----	

-/--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>GRUENEWALD JAN ET AL: "Chemo- and regioselective peptide cyclization triggered by the N-terminal fatty acid chain length: The recombinant cyclase of the calcium-dependent antibiotic from <i>Streptomyces coelicolor</i>." BIOCHEMISTRY, vol. 43, no. 10, 16 March 2004 (2004-03-16), pages 2915-2925, XP002304808 ISSN: 0006-2960 the whole document</p> <p>-----</p>	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE2004/001704

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0105815	A	25-01-2001	AU 5310600 A BR 0012481 A CA 2378868 A1 CN 1361791 T EP 1198471 A1 HU 0202315 A2 JP 2003505042 T MX PA02000458 A NO 20020183 A WO 0105815 A1	05-02-2001 02-04-2002 25-01-2001 31-07-2002 24-04-2002 28-10-2002 12-02-2003 02-07-2002 13-03-2002 25-01-2001
WO 02085401	A	31-10-2002	CA 2444626 A1 EP 1389126 A1 WO 02085401 A1 US 2003144184 A1	31-10-2002 18-02-2004 31-10-2002 31-07-2003
US 2002192773	A1	19-12-2002	NONE	
WO 9828434	A	02-07-1998	WO 9828434 A1 CA 2273071 A1 JP 2001507027 T US 6307018 B1	02-07-1998 02-07-1998 29-05-2001 23-10-2001
WO 9634878	A	07-11-1996	CA 2218620 A1 WO 9634878 A1 AT 203248 T AU 711451 B2 AU 2474095 A DE 69521815 D1 DE 69521815 T2 DK 832096 T3 EP 0832096 A1 GR 3036895 T3 JP 11508874 T PT 832096 T SI 832096 T1 US 6184344 B1	07-11-1996 07-11-1996 15-08-2001 14-10-1999 21-11-1996 23-08-2001 04-04-2002 01-10-2001 01-04-1998 31-01-2002 03-08-1999 30-01-2002 31-12-2001 06-02-2001

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12P21/00 C07K1/107 C07K5/12 C07K7/06 C07K7/50
C07K7/64 A61K38/12

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12P C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CAB Data, Sequence Search, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01/05815 A (LILLY CO ELI ; KREUZMAN ADAM JOSEPH (US); KULANTHAIVEL PALANIAPPAN (US) 25. Januar 2001 (2001-01-25) Ansprüche 1-11	15
X	WO 02/085401 A (HONG TERESA B ; WARING ALAN J (US); LEHRER ROBERT I (US); UNIV CALIFOR) 31. Oktober 2002 (2002-10-31) Seite 15, Zeile 9 - Seite 18, Zeile 5; Ansprüche 1-19	15
A	US 2002/192773 A1 (MARAHEIL MOHAMMED A ET AL) 19. Dezember 2002 (2002-12-19) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	
	-/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

10. November 2004

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

23/11/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>KOHLI RAHUL M ET AL: "Generality of peptide cyclization catalyzed by isolated thioesterase domains of nonribosomal peptide synthetases"</p> <p>BIOCHEMISTRY, Bd. 40, Nr. 24, 19. Juni 2001 (2001-06-19), Seiten 7099-7108, XP002304805 ISSN: 0006-2960 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	
A	<p>TSENG CLAIRE C ET AL: "Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase."</p> <p>BIOCHEMISTRY, Bd. 41, Nr. 45, 12. November 2002 (2002-11-12), Seiten 13350-13359, XP002304806 ISSN: 0006-2960 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	
A	<p>KEATING T A ET AL: "Chain termination steps in nonribosomal peptide synthetase assembly lines: directed acyl-S-enzyme breakdown in antibiotic and siderophore biosynthesis."</p> <p>CHEMBIOCHEM : A EUROPEAN JOURNAL OF CHEMICAL BIOLOGY. 2 FEB 2001, Bd. 2, Nr. 2, 2. Februar 2001 (2001-02-02), Seiten 99-107, XP002304807 ISSN: 1439-4227 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	
A	<p>WO 98/28434 A (SCRIPPS RESEARCH INST ; BARK STEVEN J (US); CANNE LYNNE (US); DAWSON P) 2. Juli 1998 (1998-07-02) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	
A	<p>WO 96/34878 A (SCRIPPS RESEARCH INST ; DAWSON PHILIP E (US); MUIR TOM W (US); KENT ST) 7. November 1996 (1996-11-07) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>GRUENEWALD JAN ET AL: "Chemo- and regioselective peptide cyclization triggered by the N-terminal fatty acid chain length: The recombinant cyclase of the calcium-dependent antibiotic from Streptomyces coelicolor."</p> <p>BIOCHEMISTRY, Bd. 43, Nr. 10, 16. März 2004 (2004-03-16), Seiten 2915-2925, XP002304808 ISSN: 0006-2960 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung

1, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/001704

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0105815	A	25-01-2001	AU	5310600 A	05-02-2001
			BR	0012481 A	02-04-2002
			CA	2378868 A1	25-01-2001
			CN	1361791 T	31-07-2002
			EP	1198471 A1	24-04-2002
			HU	0202315 A2	28-10-2002
			JP	2003505042 T	12-02-2003
			MX	PA02000458 A	02-07-2002
			NO	20020183 A	13-03-2002
			WO	0105815 A1	25-01-2001
WO 02085401	A	31-10-2002	CA	2444626 A1	31-10-2002
			EP	1389126 A1	18-02-2004
			WO	02085401 A1	31-10-2002
			US	2003144184 A1	31-07-2003
US 2002192773	A1	19-12-2002	KEINE		
WO 9828434	A	02-07-1998	WO	9828434 A1	02-07-1998
			CA	2273071 A1	02-07-1998
			JP	2001507027 T	29-05-2001
			US	6307018 B1	23-10-2001
WO 9634878	A	07-11-1996	CA	2218620 A1	07-11-1996
			WO	9634878 A1	07-11-1996
			AT	203248 T	15-08-2001
			AU	711451 B2	14-10-1999
			AU	2474095 A	21-11-1996
			DE	69521815 D1	23-08-2001
			DE	69521815 T2	04-04-2002
			DK	832096 T3	01-10-2001
			EP	0832096 A1	01-04-1998
			GR	3036895 T3	31-01-2002
			JP	11508874 T	03-08-1999
			PT	832096 T	30-01-2002
			SI	832096 T1	31-12-2001
			US	6184344 B1	06-02-2001